

Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук»

На правах рукописи

Ри Наталья Александровна

**«АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ
УТИЛИЗАЦИИ НИТРИТА В КЛЕТКЕ *ESCHERICHIA
COLI* МЕТОДАМИ МАТЕМАТИЧЕСКОГО
МОДЕЛИРОВАНИЯ»**

Специальность - 03.01.09
Математическая биология, биоинформатика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н., в.н.с. Хлебодарова
Тамара Михайловна

Новосибирск – 2018

Содержание

Введение	5
Глава I. Обзор литературы.....	13
1.1. Особенности структурно-функциональной организации дыхательной цепи у <i>E. coli</i>	13
1.1.1. Хиноны - низкомолекулярные переносчики электронов.....	15
1.1.2. Механизмы формирования мембранного потенциала.....	19
1.1.3. F ₁ F ₀ АТФ-синтаза как структурный компонент конечного этапа респираторной цепи.....	22
1.2. Анаэробное дыхание на нитрате и нитрите.....	24
1.2.1. Основные регуляторы нитрат-нитритного метаболизма.....	27
1.2.2. Молекулярно-генетические механизмы регуляции экспрессии ферментов утилизации нитрита в клетке <i>E. coli</i>	30
1.2.3. Механизмы формирования цепи передачи электронов в условиях дыхания на нитрите.....	34
1.3. Tat система транспорта белков в периплазму.....	37
1.4. Пути утилизации нитрита различными видами бактерий.....	40
1.5. Математическое моделирование процессов клеточного дыхания.....	43
1.5.1. Поточковые модели	44
1.5.2. Динамические модели	46
1.6. Заключение по обзору литературы.....	52
2. Глава II. Исследование механизмов регуляции скорости утилизации нитрита клетками <i>E. coli</i>.....	53
2.1. Методы расчета и анализа.....	53
2.2. Базовая модель утилизации нитрита клетками <i>E. coli</i> (M1).....	55
2.2.1. Основные принципы базовой модели	55
2.2.2. Вывод скорости утилизации нитрита периплазматической нитритредуктазой Nrf.....	58
2.2.3. Вывод скорости утилизации нитрита цитоплазматической нитритредуктазой NirB	61
2.2.4. Вывод скоростей импорта и экспорта нитрита транспортером NirC	63

2.2.5.	Оценка параметров модели M1	64
2.2.6.	Оценка скорости утилизации нитрита нитритредуктазами NrfA и NirB	67
2.2.7.	Анализ транспортных потоков нитрита и его утилизации внутри клетки	69
2.2.8.	Анализ источников дополнительной нитрит- утилизирующей активности в области низких концентраций субстрата в среде	72
2.2.9.	Анализ возможных механизмов, влияющих на активность периплазматической нитритредуктазы	74
2.3.	Математическая модель M2 утилизации нитрита клетками <i>E. coli</i>	78
2.3.1.	Подсистема переработки внеклеточного нитрита в аммоний периплазматической формат-зависимой Nrf редуктазой	79
2.3.2.	Подсистема импорта внеклеточного нитрита в клетку	80
2.3.3.	Подсистема экспорта внутриклеточного нитрита из клетки в хемостат	80
2.3.4.	Подсистема утилизации внутриклеточного нитрита цитоплазматической НАДН-зависимой NirB редуктазой	81
2.3.5.	Подсистема синтеза белков NrfA, NrfB, NirB, NirC и NirD	82
2.3.6.	Подсистема секреции субъединиц NrfA и NrfB Nrf нитритредуктазы из цитоплазмы в периплазму	83
2.3.7.	Подсистема формирования активной формы NirC транспортера	85
2.3.8.	Подсистема формирования активной формы периплазматической Nrf редуктазы	85
2.3.9.	Подсистема формирования активной формы цитоплазматической NirB редуктазы	86
2.3.10.	Подсистема процессов деградации и разбавления концентрации белков и их комплексов в процессе роста клеток	87

2.3.11.Подсистема протока нитрита через хемостат	87
2.3.12.Модель утилизации нитрита, учитывающая влияние мембранного потенциала на транспорт периплазматических белков NrfA и NrfB	87
2.3.13.Оценка параметров модели	90
2.3.14.Оценка скоростей транспорта и утилизации нитрита	92
2.3.15.Оценка вклада различных механизмов регуляции активности периплазматической Nrf редуктазы в утилизацию нитрита	97
3. Глава III. Реконструкция молекулярно-генетических механизмов формирования мембранного потенциала в условиях роста клеток <i>E. coli</i> на нитрите.....	102
3.1. Форматдегидрогеназы в процессах дыхания на нитрите	104
3.2. Сценарии формирования мембранного потенциала на нитрите	105
3.2.1. Сценарий формирования мембранного потенциала с участием форматлиазного комплекса FHL-1	105
3.2.2. Сценарий формирования мембранного потенциала с участием форматлиазного комплекса FHL-2	108
3.3. Математическая модель формирования мембранного потенциала ...	110
3.3.1. Математическая модель (M3) формирования мембранного потенциала с участием FHL-1 комплекса	110
3.3.2. Математическая модель (M4) формирования мембранного потенциала с участием FHL-2 комплекса	117
3.3.3. Оценка параметров математических моделей по сценариям 1 и 2	120
3.3.4. Влияние различных механизмов формирования мембранного потенциала на динамику накопления нитрита в хемостате	126
4. Заключение	129
5. Выводы	132
6. Список литературы	134

Введение

Актуальность темы исследования

Исследование взаимосвязи между структурно-функциональной организацией генных сетей и их динамическими свойствами является фундаментальной научной проблемой, а метод математического моделирования – наиболее адекватным подходом для ее решения. Ограничением для реализации этого подхода может быть отсутствие необходимых экспериментальных данных о структуре и функциях конкретной молекулярно-генетической системы, представляющей интерес с той или иной точки зрения. В связи с этим наиболее оправдано использование в качестве объекта исследования бактерии *Escherichia coli*, которая в настоящее время считается одной из наиболее изученных в молекулярно-генетическом плане.

В настоящей работе метод математического моделирования использован для анализа механизмов функционирования нитритной респираторной системы в условиях анаэробного дыхания у бактерии *E. coli*. Эта система представляет интерес с разных точек зрения. Во-первых, этот тип дыхания наиболее характерен для *E. coli* в естественных местах ее обитания в кишечнике млекопитающих и, в частности, человека. В кишечнике человека *E. coli* составляет менее одного процента от общей массы микробиома [Yang, Jobin, 2014], однако она играет важную роль в синтезе витаминов, переваривании пищи, а также в утилизации кислорода, который оказывает ингибирующее действие на рост полезных для человека бифидо- и лактобактерий [Bentley, Meganathan, 1982; Jones et al., 2011]. Предпочтительная активация этой респираторной системы у *E. coli* определяется возможностью поступления нитрата, как предшественника нитрита, с пищей, а также особенностями нитрата, как субстрата для дыхания, являющегося самым сильным акцептором электронов в цепи передачи электронов и наиболее выгодным с точки зрения продукции АТФ. Однако нитрит, который образуется в процессе утилизации нитрата, токсичен не только для бактериальных клеток, но и для клеток хозяина, а побочные продукты утилизации нитрита обладают мутагенным свойством [Weiss, 2006]. Все это подразумевает тесную взаимосвязь генетических систем, включенных в нитрат-ассоциированную цепь передачи электронов и нитритного метаболизма, динамические аспекты функционирования которой не исследованы.

Во-вторых, в процессе утилизации нитрата образуется нитрит и другие метаболиты, которые токсичны не только для бактериальных клеток, но и для клеток хозяина, а побочные продукты утилизации нитрита обладают также мутагенным действием [Weiss, 2006]. Тем не менее, несмотря на токсичность нитрита, клетки *E. coli* растут в условиях культивирования на нитрите и используют его в качестве источника электронов для синтеза АТФ, хотя и с меньшей эффективностью, чем нитрат. Это подразумевает тесную взаимосвязь генетических систем, включенных в нитрит-ассоциированную цепь передачи электронов и нитритного метаболизма, динамические аспекты функционирования которой не исследованы.

И наконец, механизмы регуляции нитрат-нитритной респираторной системы у *E. coli* представляют интерес с точки зрения ее включения в патологический процесс, связанный с воспалением в местах обитания *E. coli*, и могут быть мишенью воздействия на нее при ликвидации последствий заболевания: при воспалительном процессе происходит активация этой системы в результате выработки клетками хозяина оксида азота, который превращается в нитрат [Winter et al., 2013], что ведет к активному росту клеток *E. coli* (до 10% при воспалении мочевыводящих путей), дисбалансу микрофлоры [Winter et al., 2013] и накоплению продуктов утилизации нитрата/нитрита, которые обладают мутагенным действием [Weiss, 2006]. Более того, было показано наличие связи между способностью бактерии синтезировать нитрит и развитием раковых опухолей в тканях мочевого пузыря [El-Mosalamy 2012]. В связи с этим механизмы контроля внутриклеточного содержания нитрита и его утилизации в нетоксичные продукты представляют особый интерес.

Основными компонентами системы утилизации нитрита являются нитритредуктазы: периплазматическая Nrf редуктаза (или цитохром c₅₅₂) и НАДН-зависимая NirB редуктаза, которые были описаны в середине прошлого века [Cole 1968]. Было показано, что Nrf и NirB ферменты имеют различную клеточную локализацию и метаболическую роль. Nrf редуктаза локализована в периплазме клетки и является респираторным ферментом, обеспечивающим синтез АТФ. NirB редуктаза локализована в цитоплазме, и ее основной ролью является детоксикация избыточного нитрита в клетке. Оба фермента метаболизируют нитрит до аммония, который может быть использован клеткой для синтеза аминокислот [Mäntsälä,

Zalkin, 1976]. Генетические механизмы регуляции экспрессии генов, кодирующих структуры этих белков, в настоящее время достаточно хорошо исследованы [Wang, Gunsalus, 2000], однако динамические аспекты их взаимодействия и роль отдельных компонентов этой системы в контроле внутриклеточного содержания нитрита не известны.

Не менее важная роль в процессах утилизации нитрита и контроля его внутриклеточного содержания отводится системе активного транспорта нитрита в клетку и из клетки. В настоящее время известно три транспортных белка: NarK, NarU и NirC, которые участвуют в транспорте нитрита через цитоплазматическую мембрану [Clegg et al., 2002], однако существенно более высокой активностью в отношении нитрита обладает белок NirC [Jia et al., 2009], каталитические свойства которого у *E. coli* до сих пор не изучены.

Расположение гена *nirC*, кодирующего структуру этого белка, в одном опероне с геном *nirB*, свидетельствует о тесной связи внутриклеточной системы утилизации нитрита NirB редуктазой с системой его транспорта, однако конкретных данных о взаимоотношении этих систем, определяющих динамику накопления и утилизации нитрита в клетке и его экспорта из клетки, также нет.

Более того, до сих пор респираторная система *E. coli* в условиях анаэробного дыхания на нитрите изучена недостаточно: неизвестна структура цепи передачи электронов с нитритом в качестве акцептора, неизвестен тип низкомолекулярного переносчика электронов – хинона между донором и акцептором электронов.

Исходя из вышеизложенного были сформулированы следующие цели и задачи диссертационной работы.

Цели и задачи диссертационной работы

Целью настоящей работы является изучение механизмов функционирования респираторной системы *E. coli* в условиях анаэробного дыхания на нитрите и исследование вклада отдельных компонентов этой системы в кинетику утилизации нитрита методами математического моделирования.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать модель утилизации нитрита клетками *E. coli* в глюкозо-лимитированных условиях стационарного роста культуры в проточном хемостате и адаптировать ее к экспериментальным данным по динамике

экспрессии генов *nrfA*, *nirB* и *nirC*, кодирующих белки, входящие в состав ферментов, утилизирующих и транспортирующих нитрит.

2. Исследовать вклад Nrf и NirB нитритредуктаз и транспортного белка NirC в кинетику утилизации нитрита культурой клеток *E. coli* в проточном хемостате.
3. Реконструировать структуру респираторной цепи в условиях дыхания на нитрите при культивировании клеток *E. coli* в проточном хемостате и разработать структурную модель формирования цепи передачи электронов от донора к акцептору.
4. Исследовать динамику функционирования модели утилизации нитрита, дополненную молекулярно-генетическими механизмами формирования протонного градиента, в условиях анаэробного дыхания на нитрите при культивировании клеток *E. coli* в проточном хемостате.
5. Исследовать вклад мембранного потенциала в регуляцию активности респираторной Nrf нитритредуктазы в условиях стационарного роста и дыхания на нитрите при культивировании клеток *E. coli* в проточном хемостате.

Научная новизна работы

Впервые разработана математическая модель утилизации нитрита клетками *E. coli*, учитывающая молекулярно-генетические механизмы регуляции экспрессии генов, кодирующих структуру периплазматической и цитоплазматической нитритредуктаз и транспортного белка NirC, которая позволила исследовать вклад различных компонентов этой системы в кинетику утилизации нитрита в условиях стационарного роста культуры клеток.

В ходе выполнения исследования показано, что учет молекулярно-генетических механизмов регуляции экспрессии генов, кодирующих субъединицы ферментов, утилизирующих и транспортирующих нитрит, не позволяет описать экспериментально наблюдаемую кинетику утилизации нитрита в хемостате в области низких концентраций нитрита в среде (ниже 2 мМ) без дополнительных предположений.

Высказана гипотеза, что дополнительная нитрит-утилизирующая активность в области концентраций нитрита в среде менее 1 мМ может быть реализована за счет локального изменения концентрации периплазматической Nrf нитритредуктазы при переходе из цитоплазмы в периплазму под действием мембранного потенциала,

формирование которого является следствием активности ферментов респираторной цепи.

Модель утилизации нитрита, включающая гипотетические механизмы формирования мембранного потенциала в условиях дыхания на нитрите, не противоречащие условиям проточного хемостата, предсказывает, что действие мембранного потенциала не зависит от сценария его формирования.

Впервые показано, что мембранный потенциал, независимо от сценария его формирования, является достаточным механизмом регуляции активности респираторной периплазматической Nrf редуктазы, обеспечивающим корректное описание кинетики утилизации нитрита в хемостате.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Теоретическая значимость работы обоснована тем, что впервые изучены динамические аспекты функционирования респираторной системы анаэробного дыхания на нитрите в глюкозо-лимитированных условиях стационарного роста клеток *E. coli* и выявлен новый механизм регуляции нитрит-утилизирующей активности при концентрациях субстрата, характерных для естественных мест обитания энтеробактерий. Показано, что этот механизм у *E. coli* связан с действием мембранного потенциала на секрецию субъединиц Nrf нитритредуктазы из цитоплазмы в периплазму и формированием активной формы фермента в периплазматическом пространстве клетки. Предполагается, что этот механизм может быть важен для других периплазматических ферментов, локальная активность которых в периплазме зависит не только от скорости их синтеза в цитоплазме, но и от скорости секреции их компонентов в периплазму.

Теоретически показано, что механизм действия мембранного потенциала не зависит от сценария его формирования. Не исключено, что реализация конкретного сценария может быть связана с особенностями функционирования респираторных ферментов в конкретных условиях внешней среды, однако подтверждения этому с помощью экспериментальных методов пока нет. В целом результаты, полученные в ходе моделирования, дополняют имеющиеся представления о респираторной системе *E. coli*, использующей в качестве субстрата токсичные для клетки вещества,

каковым является нитрит, и могут послужить основой для дальнейших экспериментальных исследований системы утилизации нитрита у *E. coli*.

Математические модели утилизации нитрита клетками *E. coli*, разработанные в ходе выполнения диссертационной работы, подробно описаны в соответствующих публикациях, которые находятся в открытом доступе и могут быть использованы другими исследователями. Часть подмоделей, описывающих отдельные процессы в метаболическом пути утилизации нитрита, представлены в базе данных MAMMOTH [Kazantsev et al., 2017] и доступны на сайте <http://mammoth.biomodelsgroup.ru>.

Положения, выносимые на защиту:

1. Особенности молекулярно-генетических механизмов регуляции экспрессии *nrf* и *nir* оперонов, кодирующих субъединицы респираторной и цитоплазматической нитритредуктазы у *E. coli*, позволяют объяснить наблюдаемую скорость утилизации нитрита в хемостате при концентрации субстрата в среде выше 2 мМ и не достаточны для объяснения таковой при концентрациях ниже 2 мМ.
2. Мембранный потенциал является достаточным механизмом регуляции активности периплазматической Nrf редуктазы у *E. coli*, обеспечивающим необходимую скорость утилизации нитрита в хемостате при концентрации субстрата в среде ниже 2 мМ.

Апробация работы

Материалы настоящей работы были представлены на отчетной сессии Института цитологии и генетики СО РАН в 2017 году. Основные результаты работы были представлены на следующих научных конференциях: 7-й, 10-й и 12-й Международных конференциях по биоинформатике регуляции и структуры генома\системной биологии (BGRS\SB 2010, 2016, 2018; Новосибирск), IV и V Международных конференциях «Математическая биология и биоинформатика» (ICMBV 2012, 2014; Пущино), 9-й международной школе молодых ученых «Systems Biology and Bioinformatics» (2017, Ялта, Республика Крым, Россия).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 13 работ, из них пять в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК и восемь работ в сборниках тезисов конференций.

Структура работы

Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, заключения и списка литературы (237 наименования). Материал изложен на 155 страницах и содержит 8 таблиц и 27 рисунков.

Первая глава посвящена обзору литературы, в котором отражена степень изученности метаболического пути утилизации нитрита клетками *E. coli* и рассматриваются известные регуляторные механизмы, а также приводится обзор математических моделей процессов дыхания в бактериях и эукариотических клетках.

Вторая глава посвящена разработке и исследованию базовой модели утилизации нитрита M1, с помощью которой исследуются механизмы регуляции скорости утилизации нитрита как внеклеточного, так и внутриклеточного, в условиях анаэробного культивирования клеток *E. coli* в проточном хемостате. Проведен анализ базовой модели, который показал, что существует дополнительный механизм, влияющий на скорость утилизации нитрита из окружающей среды, который связан с влиянием мембранного потенциала на активность периплазматической нитритредуктазы. Данное предположение было подтверждено на основании анализа расширенной модели M2 утилизации нитрита клетками *E. coli*.

В третьей главе проводится реконструкция неизученного механизма формирования мембранного потенциала в условиях культивирования бактерий на нитрите. Для исследования влияния мембранного потенциала на скорость накопления нитрита в хемостате разработаны модели M3/2 и M4/2 на базе расширенной модели M2, которая была дополнена гипотетическими молекулярно-генетическими механизмами формирования мембранного потенциала с участием форматлиазных ферментативных комплексов FHL-1 и FHL-2 соответственно.

В заключении сформулированы основные результаты работы.

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю д.б.н. Т.М. Хлебодаровой и научному консультанту д.б.н. В.А. Лихошваю за помощь в работе и плодотворное обсуждение, а также к.б.н. С.А. Лашину и к.б.н. А.С. Розанову за ценные советы и замечания.

Глава I. Обзор литературы

Обзор литературы посвящен анализу существующих данных о структурно-функциональных организациях цепей переноса электронов у *E. coli* с акцентом на организацию респираторной системы в условиях анаэробного дыхания на нитрате и нитрите. Подробно описана организация системы утилизации нитрита в клетке *E. coli*, состоящей из респираторной и ассимиляционной систем, а также описаны молекулярные механизмы регуляции генов, кодирующих ферменты утилизации и транспорта нитрита. Заключительная часть посвящена описанию существующих подходов к моделированию процессов клеточного дыхания и обзору существующих моделей респираторных систем как у прокариот, так и у эукариот.

1.1. Особенности структурно-функциональной организации дыхательной цепи у *E. coli*

Среди бактерий наиболее распространенными являются хемотробы – организмы, получающие энергию в результате окислительно-восстановительных реакций расщепления химических веществ. Среди них выделяют хемоавторофов, способных самим синтезировать углеводородные соединения в ходе окисления неорганических соединений, и хемогетеротрофов, требующих внешнего источника углеводов и получающих энергию за счет окислительно-восстановительных реакций. К хемогетеротрофам относят бактерию *E. coli*, которая способна формировать широкий спектр метаболических путей, обеспечивающих её жизнеспособность в различных условиях внешней среды [Elsas et al., 2011]. Метаболизм бактерии *E. coli* хорошо приспособлен для выживания даже в присутствии следовых количеств низкомолекулярных субстратов в окружающей среде. Естественной средой обитания *E. coli* является толстый отдел кишечника млекопитающих, для которого характерны анаэробные и микроаэробные условия, позволяющие клеткам бактерий обеспечивать себя энергией через процессы дыхания.

Дыхательная цепь представляет собой цепь переноса электронов от донора к акцептору через пул хинонов, которая формируется в результате активности ферментов, расположенных на цитоплазматической мембране бактерии [Unden,

Bongaerts, 1997], и обеспечивает формирование протонного градиента и сопряженного с ним синтеза АТФ. Модульный принцип формирования дыхательной цепи *E. coli* позволяет использовать различные субстраты как в качестве доноров, так и в качестве электронных акцепторов, обеспечивая тем самым высокую степень адаптивности ее респираторной системы к внешним условиям по сравнению с другими представителями микробиоты. Исследования мутантных линий *E. coli* с делециями генов, продукты которых вовлечены в разные цепи переноса электронов, показали, что в зависимости от обогащённости тканей кишечника кислородом в клетках *E. coli* активируются либо аэробные респираторные ферменты, либо анаэробные [Jones et al., 2007].

На рис. 1 представлена общая схема структуры дыхательной цепи у *E. coli*, компоненты которой образуют пары донор-акцептор, между которыми, в результате активности соответствующих ферментов (дегидрогеназ и редуктаз), формируется цепь передачи электронов. Посредниками в этой цепи выступают хиноны.

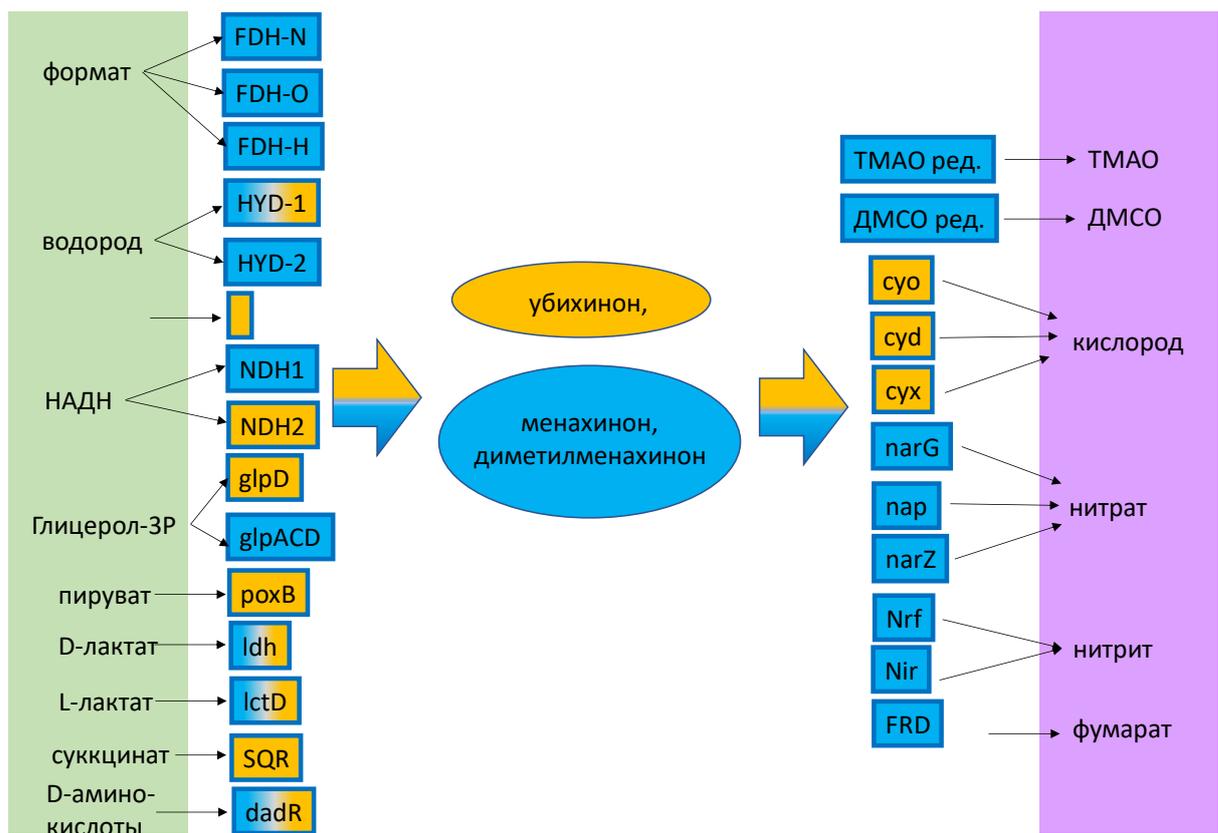


Рис. 1. Модульный принцип организации дыхательной цепи *E. coli*. Цепь переноса электронов состоит из донора электронов (первая колонка), дегидрогеназы (вторая колонка), хинонов (различные типы хинонов показаны в овалах), терминальной редуктазы (третья колонка) и акцептора электронов (четвертая колонка). Ферменты и метаболиты, принимающие участие в аэробном дыхании, показаны желтым цветом, а в анаэробном дыхании – синим. Ферменты, работа которых не зависит от присутствия кислорода, показаны двумя цветами.

Для бактерии *E. coli* характерно наличие 15 дегидрогеназ и 11 терминальных редуктаз, активность которых определяется доступностью субстратов, наличием кислорода и других факторов окружающей среды [Price, Driessen, 2010]. Присутствие в среде тех или иных хинонов также определяется типом дыхания.

В анаэробных и микроаэробных условиях, которые являются наиболее естественными для клеток *E. coli*, основными донорами электронов являются формат и НАДН, которые синтезируются из простых сахаров в процессе гликолиза и в цикле трикарбоновых кислот, а акцепторами электронов служат нитрат и фумарат. Источником углеводов для бактерий служат моно- и дисахариды, которые синтезируются другими представителями микрофлоры, а также, согласно данным Бьюли [Beaulieu, Quaroni, 1991], клетками эпителия в результате распада полисахаридов [Jones et al., 2007].

Общий принцип организации цепи передачи электронов от донора к акцептору сохраняется, несмотря на то, что разный состав сред определяет различный набор ферментов. Единым ферментом для всех типов дыхательных цепей является белковый комплекс – АТФ-синтаза, которая функционирует на конечном этапе респираторной цепи и приводит к накоплению энергии в виде АТФ. Связь между белковыми комплексами в мембране осуществляют молекулы небелкового происхождения – хиноны.

1.1.1. Хиноны - низкомолекулярные переносчики электронов

Хиноны – это жирорастворимые молекулы, которые являются посредниками в цепи переноса электронов от донора к акцептору. Респираторный процесс окисления донора сопровождается переносом двух электронов и двух протонов на хиноны, переводя их в восстановленное состояние, называемое хинолами. Обратная реакция окисления хинолов протекает совместно с восстановлением акцептора. *E. coli* синтезирует три типа хинонов: бензохинон - убихинон (UQ), и два нафтохинона – менахинон (МК) и диметилменахинон (DMK). Все три вида хинонов способны растворяться в цитоплазматической мембране, где и функционирует дыхательная цепь. Возможность растворяться в липидном бислое обеспечивается наличием в структуре всех трех хинонов боковой цепи, составленной из повторяющихся изопреноидных фрагментов (рис. 2). Количество звеньев часто

указывается в названии хинонов – UQ-n, где n указывает на кратность повторения изопреноидных остатков. В бактерии *E. coli* нарабатывается преимущественно форма UQ-8, хотя в следовых количествах присутствуют и формы хинона с n=1–7, 9, 10. Среди менахинонов и диметилменахинонов широко распространенными формами являются МК-8 и DMK-8, но в следовых количествах присутствуют менахиноны с n=6 и n=9 и диметилменахиноны, для которых характерно n=7. На рис. 2 показаны структурные формулы окисленных и восстановленных форм убихинона, менахинона и диметилменахинона.

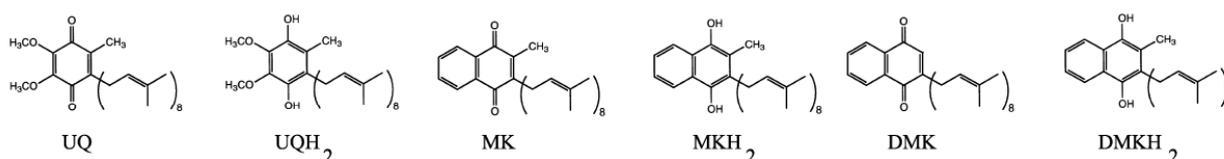


Рис. 2. Структурные формулы убихинона (UQ-8), убихинола (UQ₂-8), менахинона (МК-8) менахинола (МК₂-8), диметименахинона (DMK-8) и диметименахинола (DMK₂-8).

В процесс передачи электронов на различные акцепторы вовлечены преимущественно один или два типа хинона. Убихинон используется при аэробном дыхании, когда акцептором служит кислород. Считается, что клеточные окислительно-восстановительные реакции протекают, если разница между потенциалами полуреакций для восстановителя и окислителя составляет 150-200 мВ. Поскольку потенциал полуреакции восстановления менахинона на 200 мВ меньше, чем для убихинона (табл. 1), то МК и DMK, по сравнению с UQ, в большей степени вовлечены в дыхательные процессы, в которых потенциал акцепторов меньше потенциала для пары кислород-вода (табл. 1), что характерно для анаэробного дыхания [Sharma et al., 2012].

Оба нафтохинона (МК и DMK) в общем случае используются для анаэробного дыхания с такими акцепторами, как ДМСО, ТМАО и фумарат [Uden, Bongaerts, 1997]. Однако для ряда акцепторов можно выделить преимущественное использование того или иного хинона. Так, процессы дыхания на фумарате и ДМСО требуют участия МК, тогда как электроны с водорода переходят преимущественно на DMK [R. Meganathan, Neidhard, 1996 Ch39]. В цепи переноса электронов, акцептором в которой является нитрат, для передачи электронов может быть

использован любой тип хинона, однако основную роль в дыхании на нитрате играет DMK [Wissenbach et al., 1990].

Таблица 1. Потенциалы полуреакций (мВ) для электронных акцепторов [Uden, Bongaerts, 1997].

O ₂ /H ₂ O	+820
UQ/UQH ₂	+110
МК/МКН ₂	-72
ДМХ/ДМХН	+36
фумарат/сукцинат	+30
ДМСО/ДМС	+160
НАД/НАДН ₂	-320
нитрат/нитрит	+420

Биосинтез хинонов подвержен регуляции со стороны кислорода таким образом, что в аэробных условиях клетки *E. coli* содержат в четыре-пять раз больше убихинона, чем оба вида нафтохинонов вместе взятых, в то время как в анаэробных условиях нафтохиноны в три раза превышают содержание убихинона [Meganathan, Neidhard, 1996 Ch. 17].

Биосинтез всех хинонов происходит на основе шикиматного пути, продуктом которого является хоризмат, из которого синтезируется кольцо убихинона, в то время как диметилменахинон и менахинон нарабатываются из производного хоризмата – изохромата. Боковые цепи у обоих хинонов нарабатываются из пренилпирофосфата, а метильные группы – из S-аденозилметонина. Синтез МК требует участия α-кетоглутарата, АТФ и коэнзима А, а для синтеза убихинона необходим кислород (рис. 3), при этом диметилменахинон является предшественником менахинона [van Beilen, Hellingwerf, 2016].

Структура цепи биосинтеза всех трех типов хинонов, а также ферменты-участники (рис. 3) были выявлены в ходе серии экспериментов с использованием штаммов, содержащих делеции по генам, кодирующим эти ферменты [Cox et al., 1968; Lawrence et al., 1974; Nakahigashi et al., 1992; Wissenbach et al., 1992; Müller et al., 1996]. Для множества генов, кодирующих ферменты биосинтеза убихинона, найдены лишь некоторые регуляторы, к тому же полученные данные носят противоречивый характер. Исследования Гиберта и коллег [Gibert et al., 1988] показали, что экспрессия одного из генов, продукт которого вовлечен в путь

биосинтеза убихинона (*ubiG*), в анаэробных условиях в присутствии нитрата была в 4 раза ниже по сравнению с уровнем транскрипции данного гена в аэробных условиях, когда клетки росли на глицероле. Однако механизм регуляции транскрипции, лежащий в основе денного эффекта, выявлен не был.

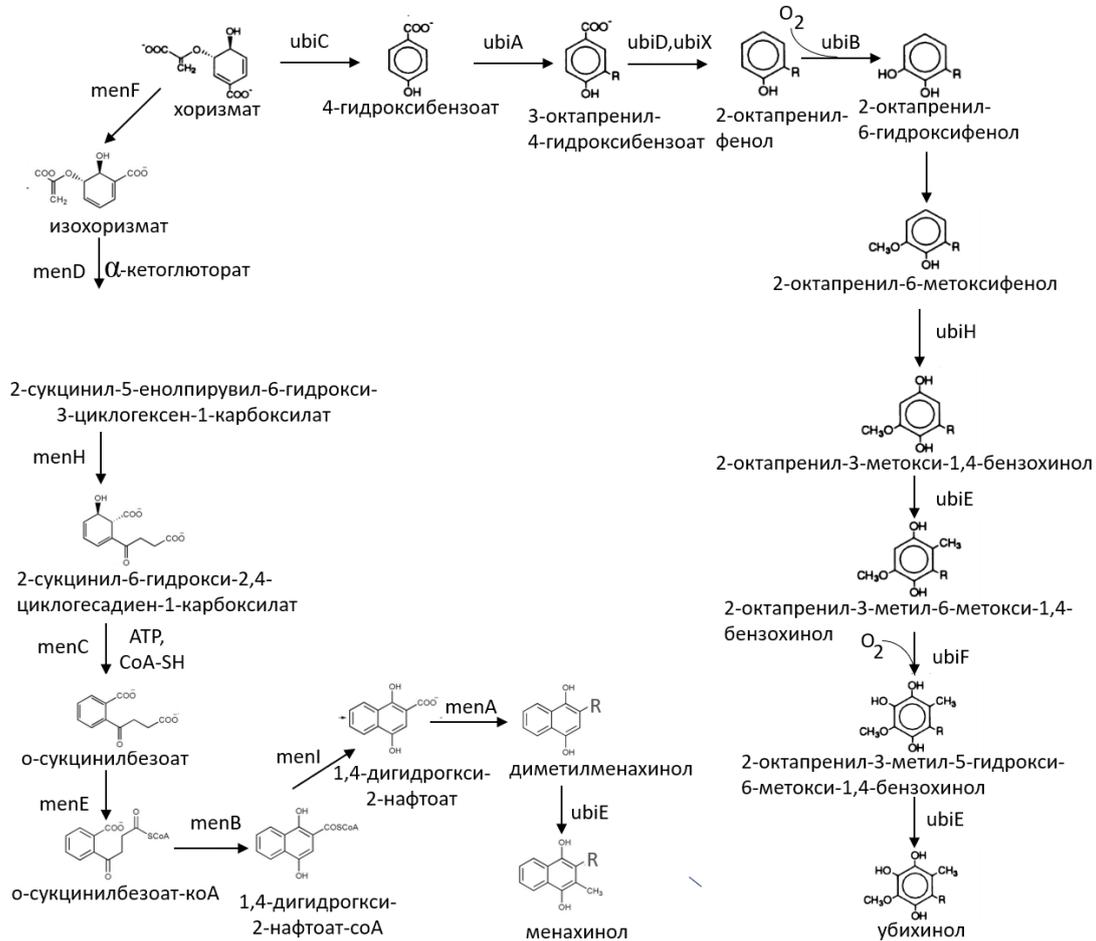


Рис. 3. Схема синтеза убихинола, диметилменахинола и менахинола из хоризмата в бактерии *E. coli*. Гены, кодирующие субъединицы ферментов, указаны рядом со стрелками

Существование регуляции биосинтеза убихинола на молекулярно-генетическом уровне подтверждается рядом исследований, в которых показано изменение уровня транскрипции генов *ubiA*, *ubiC* и *ubiD*, кодирующих структуру ферментов, катализирующих 1–3 этапы биосинтеза убихинона (см. рис. 3), через транскрипционные факторы Fnr и ArcA, вовлеченные в регуляцию микроаэробного и анаэробного дыхания. Так, исследования, опубликованные в работе [Soballe, Poole, 1997], показали, что транскрипция гена *ubiC* ингибируется кислородом через Fnr фактор, а эксперименты с делециями по гену *arcA* [Meganathan, Kwon, 2009; Kwon et al., 2005; Zhang, Javor, 2003] показали активирование экспрессии генов *ubiA*, *ubiC*

и *ubiD*, что подразумевает наличие ингибирующего эффекта ArcA фактора на транскрипцию указанных генов. Что же касается генов, кодирующих структуру ферментов пути биосинтеза менахинона и диметилменахинона, то экспериментальные данные по их регуляции отсутствуют.

В то же время существуют данные Шестопалова и коллег [Shestopalov et al., 1997], которые свидетельствуют о том, что мутации генов, кодирующих транскрипционные факторы ArcA и Fnr, не влияют на уровень хинонов в сравнении с диким типом [Shestopalov et al., 1997]. Авторы полагают, что регуляция соотношения хинонов в анаэробных и аэробных условиях происходит на посттрансляционном уровне.

В целом, учитывая приведенные выше данные и зависимость уровня хинонов от присутствия того или иного акцептора [Unden, Bongaerts, 1997] (см. также табл. 2), можно предположить многоуровневый характер регуляции соотношения хинонов в клетке в зависимости от типа дыхания, который пока экспериментально не доказан.

Таблица 2. Содержание различных типов хинонов в *E. coli* при аэробном и анаэробном росте (с различными акцепторами) на глюкозе.

Тип хинона	Содержание хинона (млМ/г сухого веса бактерий)		
	Кислород	Нитрат	Фумарат (или ДМСО)
Убихинон	0.36	-	0.09
Менахинон	0.22	0.69	0.14
Диметилменахинон	0.02	0.29	0.66

Необходимо отметить, что хиноны, благодаря своей способности перемещаться в мембране и принимать протоны, могут непосредственно участвовать в формировании мембранного потенциала. Более подробно об этом будет сказано в следующем разделе.

1.1.2. Механизмы формирования мембранного потенциала

Особенности функционирования протон-транслоцирующих ферментов респираторной цепи ведут к формированию протонного градиента. В аэробных условиях к таковым относятся пары НАДН дегидрогеназа-1 и цитохромоксидазы bd

и во, а в анаэробных – форматдегидрогеназа-N, гидрогеназы 1 и 2 и нитратредуктаза NarG. Их активность приводит к появлению протон-движущей силы, которая подразумевает неравномерное распределение протонов H^+ в пространстве по обе стороны мембраны. Отношение транспортируемых через мембрану протонов к количеству переносимых электронов H^+/e^- для различных ферментов дыхательных цепей колеблется от 0 до 2. Различия в характеристиках белковых комплексов объясняются отличиями в механизме возникновения потенциала. Первым вариантом формирования мембранного потенциала является выведение протонов из цитоплазмы в периплазматическое пространство через протонные помпы, расположенные внутри белковых комплексов, как это происходит с NDH-1 NADH-дегидрогеназой и цитохром *bd* оксидазой, связанных молекулами убихинона (рис. 4а). Во втором варианте протоны переносятся через механизм окислительно-восстановительной петли, поскольку активные сайты для дегидрогеназы и редуктазы разнесены по разные стороны мембраны. Этот механизм можно проследить в работе пары форматдегидрогеназы Fdn-N и Nar нитратредуктазы, связанных между собой пулом менахионов (рис. 4б).

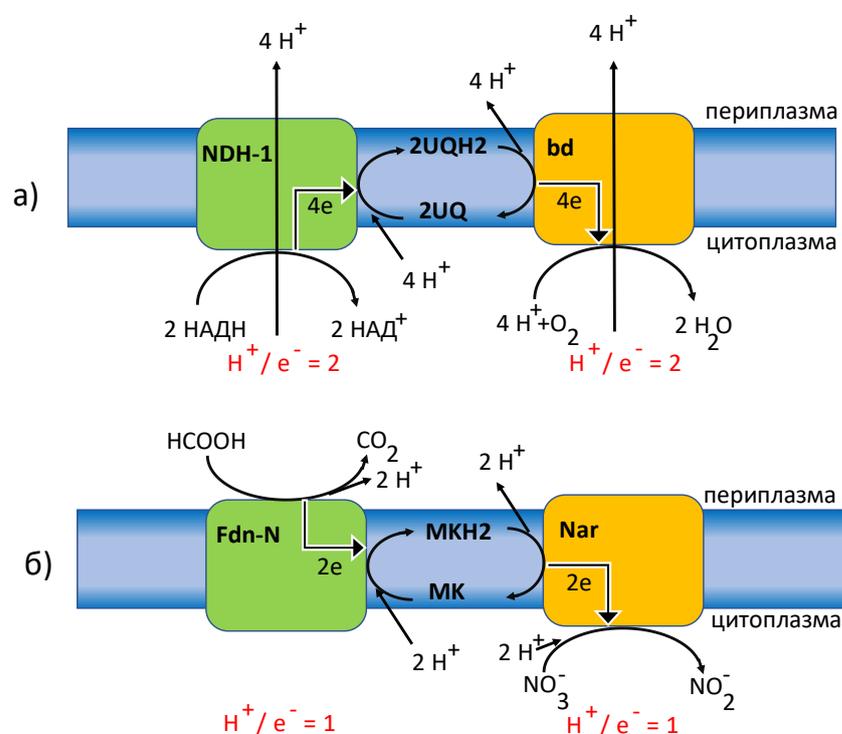


Рис. 4. Механизмы формирования мембранного потенциала. (а) – цепь переноса электронов с НАДН на кислород. NDH-1 – NADH-дегидрогеназа, *bd* – цитохром *bd* оксидаза, UQ-молекулы убихинона, UQH₂-восстановленная форма убихинола. (б) – цепь переноса электронов с Fdh-N форматдегидрогеназы на Nar нитратредуктазу, МК-менахион, МКН₂-восстановленная форма менахиона.

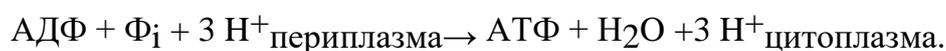
Какой бы механизм ни лежал в основе формирования потенциала, работа цепи приводит к накоплению положительно заряженных протонов со стороны периплазмы.

Неравномерное накопление зарядов по обе стороны мембраны ведет к возникновению не только химического (концентрационного) градиента протонов, но и ориентированного поперек мембраны электрического поля, то есть суммарного положительного заряда в периплазме, где происходит накопление H^+ , и отрицательного заряда по другую сторону мембраны. Таким образом, при переносе электронов в цепи переноса электронов возникает трансмембранный электрохимический градиент ($\Delta\mu_{H^+}$) ионов водорода, измеряемый в вольтах (В, мВ), который состоит из электрического (трансмембранной разности электрических потенциалов $\Delta\psi$) и химического (концентрационного) компонентов [Fischer et al., 2000]:

$$PMF = \frac{\Delta\mu}{F} = \Delta\psi - \frac{2.3RT}{F} \Delta pH$$

Где PMF – протон-движущая сила, $\Delta\mu$ – электрохимический потенциал, F – число Фарадея (Кл/моль), $\Delta\psi$ – разность потенциалов между компартментами (В), R – газовая постоянная (Дж/(моль·К)), T – абсолютная температура (К), ΔpH – разность pH между компартментами.

Полученный в ходе функционирования дыхательной цепи протонный градиент используется интегрированным в мембрану ферментом АТФ-синтазой [Maloney et al., 1974] для наработки молекул АТФ из АДФ согласно реакции:



В ходе реакции протоны принимают обратно в цитоплазму, выравнивая электрохимический градиент. Данная реакция обратима при отсутствии протонного градиента и сопровождается переносом H^+ против градиента, образуя $\Delta\mu_{H^+}$ на мембране [Deckers-Hebestreit, Altendorf, 1996]. Кислород является наиболее энергетически выгодным акцептором электронов, и аэробная цепь переноса электронов в клетках *E. coli* приводит к синтезу большего количества внутриклеточной АТФ (13 мМ/г сухих клеток) по сравнению с анаэробным дыханием (3–6 мМ/г сухих клеток) [Tran, Unden, 1998].

Таким образом, роль мембранного потенциала в клетке сводится к накоплению энергии в клетке в виде АТФ. В то же время, наличие на мембране положительного заряда со стороны периплазмы позволяет правильно ориентировать в пространстве отрицательно заряженные аминокислотные остатки на N-конце белков, что играет важную роль в транспорте белков и их позиционировании на(в) мембране [Facey, Kuhn, 2004]. Мембранный потенциал необходим также для вращения жгутика в бактерии *E. coli*, что позволяет клетке перемещаться в пространстве по направлению к источнику питательных веществ [Mogimoto, Minamino, 2014].

1.1.3. F₁F₀ АТФ-синтаза как структурный компонент конечного этапа респираторной цепи

АТФ-синтаза фермент, который функционирует на конечной стадии респираторной цепи, выполняет функцию накопления энергии за счет мембранного потенциала, сформированного в цепи переноса электронов. АТФ-синтаза располагается в мембране и катализирует две реакции: во-первых, прямую реакцию синтеза АТФ из АДФ и неорганического фосфата, используя энергию электрохимического градиента, и, во-вторых, обратную реакцию формирования градиента за счет расщепления АТФ.

Условно весь АТФ-синтазный комплекс можно разделить на два фрагмента: F₁ комплекс, расположенный в цитоплазме бактериальной клетки, и F₀ комплекс, утопленный в мембрану. Каждая из этих частей представляет собой мультимерный белковый комплекс, этапы сборки и строение которого показаны на рис. 5.

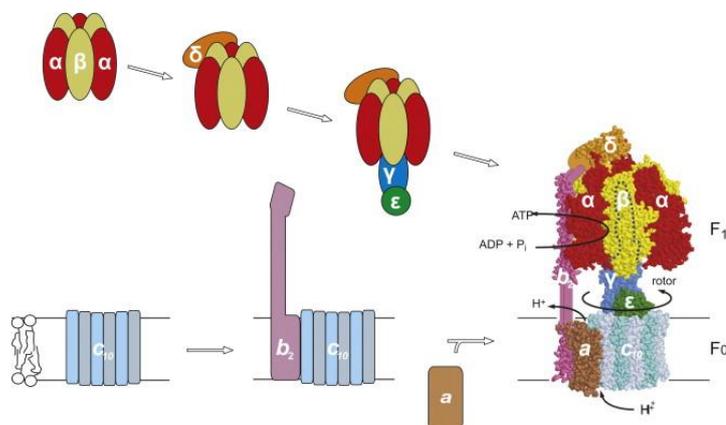


Рис. 5. Процесс сборки F₁F₀ АТФ-синтазного комплекса в *E. coli* [Price, Driessen, 2010].

F_1 часть содержит сферообразный комплекс из одной δ субъединицы и гексамера $\alpha_3\beta_3$, который осуществляет непосредственно химическую реакцию синтеза АТФ. К F_1 части относится также стеблеобразный комплекс из γ и ϵ субъединиц, объединяющий F_1 и F_0 структуры. В дополнение к центрально расположенному отделу стебля связь между двумя доменами F_1 и F_0 осуществляется за счет перемычки, расположенной в периферической части фермента и состоящей из одной δ и двух копий b белков, заякоренных в мембране гидрофобным N-концом. F_0 комплекс погружен в мембрану и составлен из одной a субъединицы и двух b субъединиц, которые располагаются снаружи от кольцеподобного олигомерного комплекса из десяти c субъединиц. Каждая c субъединица содержит два трансмембранных домена, и в то же время c -кольцо тесно связано с центральной стеблеобразной частью фермента [Price, Driessen, 2010].

Процесс формирования конечного комплекса F_1F_0 АТФ-синтазы показан на рис. 5. На первом этапе три α субъединицы должны соединиться с тремя β в $\alpha_3\beta_3$ комплекс, что запускает дальнейшее присоединение к ϵ и γ субъединицам, окончательно завершая формирование F_1 комплекса [Price, Driessen, 2010]. Формирование F_0 комплекса начинается с внедрения десяти c субъединиц в мембрану с помощью YidC белка, далее происходит самостоятельная олигомеризация кольца. Интеграция a белка в мембрану зависит от процесса внедрения b и c субъединиц в липидный бислой. Если субъединица a находится в мембране вне АТФ-синтазного комплекса, она быстро деградирует за счет работы FtsH белка.

Несмотря на то что субъединицы комплекса F_0 взаимодействуют между собой, механизмы проникновения и заякоривания в мембране происходят через различные пути. Интеграция c субъединиц определяется работой YidC белка, в то время как субъединицы a и b используют Sec транслоказу для внедрения в мембрану. Для локализации в мембране a субъединицы требуется также работа белка YidC [Price, Driessen, 2010].

Строение АТФ-синтазы напрямую обусловлено механизмом функционирования фермента в процессе синтеза АТФ. Три каталитических сайта, связывающихся с субстратами - АДФ и фосфатной группой, содержатся в β субъединицах, которые изменяют свою конформацию и сближают субстраты в

пространстве, что приводит к синтезу АТФ. В процессе наработки продукта каждый каталитический сайт находится в одном из сменяющихся по циклу трех конформационных состояний: β_E – в свободном состоянии, β_{DP} – в связанном с АДФ и фосфатом, β_{TP} – в связанном с АТФ. Последний этап синтеза, когда продукт реакции высвобождается из каталитического сайта, требует проворачивания $\gamma\epsilon$ стержня, иначе говоря, ротационного механизма за счет потока протонов через F_o фрагмент. При этом вращается только γ , ϵ и c_{10} субъединицы, в то время как остальная часть фермента остается неподвижной [Futai et al., 2012]. Вращение кольца, приводящее в движение стержень АТФ-синтазы, осуществляется за счет протонного градиента. Протоны из периплазматического пространства проходят в c субъединицу через расположенный в ней полуканал, на конце которого расположен отрицательно заряженный аминокислотный остаток аспартата Asp-61. Далее протон переходит на такой же остаток соседней субъединицы, вызывая вращение кольца. Через второй полуканал протон высвобождается в цитоплазму, где концентрация протонов мала. Таким образом, десять протонов, в соответствии с числом c субъединиц комплекса, проходя через c -кольцо, осуществляют полное вращение ферментов на 360, приводя к синтезу трех молекул АТФ [Nakanishi-Matsui et al., 2013; Fillingame et al., 2003].

Таким образом, строение АТФ-синтазы и ее локализация на мембране обеспечивают синтез АТФ и накопление энергии в клетке за счет мембранного потенциала, сформированного цепью переноса электронов.

1.2. Анаэробное дыхание на нитрате и нитрите

В анаэробных условиях наиболее энергетически выгодным акцептором электронов является нитрат. В результате его восстановления образуется нитрит, который также может служить акцептором электронов и восстанавливаться до аммония [F. C. Neidhard, 1996]. Нитрат тесно связан с нитритом не только внутри цепочки превращения одного субстрата в другой, но и единой регуляторной системой. В ответ на анаэробные условия и присутствие обоих или одного из субстратов в среде усиливается экспрессия генов, продукты которых тем или иным образом вовлечены в процессы утилизации нитрата и нитрита.

Основными компонентами системы утилизации нитрата и нитрита являются нитратредуктазы: Nar (EC 1.9.6.1) и NarG (EC 1.7.5.1) и нитритредуктазы: NrfA (EC 1.7.2.2) и NirB (EC 1.7.1.4). Эти ферменты имеют различную клеточную локализацию и метаболическую роль.

Периплазматическая Nar нитратредуктаза участвует в процессах утилизации нитрата по так называемому ассимиляционному пути, который не приводит к формированию мембранного потенциала [Grove et al., 1996; Simon, 2002]. Ферменты, гомологичные Nar нитритредуктазе *E. coli*, широко распространены среди бактерий и принимают участие в утилизации нитрата, в том числе и в условиях анаэробного фотосинтеза [Brondijk et al., 2002]. В состав комплекса входят три субъединицы: NarA, NarB и NarC, причем каталитический сайт расположен непосредственно в NarA белке, а NarC имеет интегральный мембранный домен и удерживает нитратредуктазный комплекс в прикрепленном к мембране состоянии [Potter, Cole, 1999]. NapD белок связывается с NarA, стабилизируя комплекс и предотвращая преждевременный транспорт каталитической субъединицы до ее созревания. Все белки кодируются опероном *napFDAGHBC*. Несмотря на то что остальные белки – NarF, NarG и NarH – кодируются тем же опероном и содержат железо-серный кластер, т.е. способны принимать участие в переносе электронов, они не оказывают влияние на активность периплазматической нитратредуктазы в ассимиляционных условиях. Роль NarG, NarH и NarF белков проявляется в респираторной цепи передачи электронов с глицерол-3-фосфата на убихинол и далее на нитрат в период перехода клеток от аэробных к анаэробным условиям в присутствии глицерола и низких концентраций нитрата, когда уровень убихинола достаточно высок. В данном случае NarC способен связываться с убихинолом [Brondijk et al., 2002].

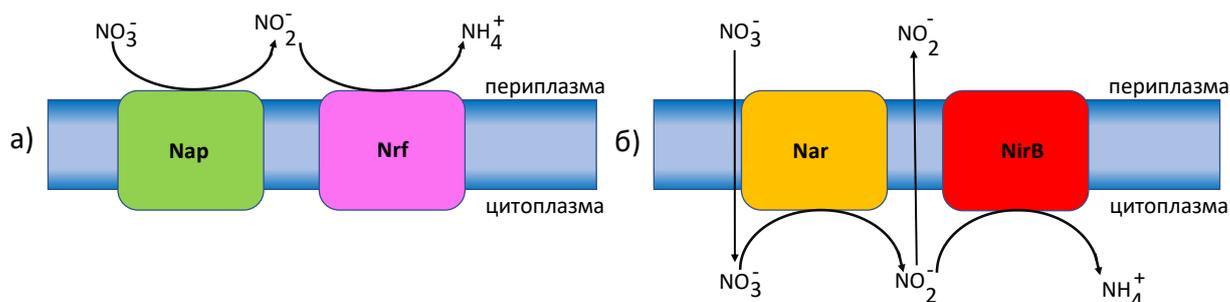


Рис. 6. Ферменты систем утилизации нитрата и нитрита у бактерии *E. coli* в присутствии низких (а) и высоких (б) концентраций субстратов в среде.

В условиях пониженного уровня нитрата и в отсутствие глицерола, формирование мембранного потенциала и продукция энергии у *E. coli* происходит за счет восстановления, синтезируемого Narp редуктазой, нитрита периплазматической NrfA нитритредуктазой (рис. 6а). Периплазматические нитрат и нитритредуктазы составляют единую систему утилизации нитрата, поскольку оба фермента синтезируются в одинаковых условиях, а именно, при пониженных концентрациях как нитрата, так и нитрита в среде [Rabin, Stewart, 1993; Wang, Gunsalus, 2000].

В условиях повышенного содержания в среде нитрата, в клетке *E. coli* синтезируется мембран-связанная нитратредуктаза NarA, которая имеет каталитический сайт, обращенный в цитоплазму, и в процессе утилизации нитрата генерирует мембранный потенциал [Stewart, Berg, 1988], необходимый для синтеза АТФ [Futai et al., 2012]. Ферментативный комплекс NarA состоит из трех субъединиц: NarG, NarH и NarI. Субъединица NarG с молекулярной массой 140 кДа содержит железо-серный каталитический сайт, NarH (58 кДа) участвует в передаче электронов за счет четырех железо-серных кластеров, а субъединица NarI (26 кДа) связана с мембраной [Bertero et al., 2005]. Донором электронов для NarA редуктазы служит форматредуктаза FdnGHI (рис. 6б), которая передает электроны с пула хинонов (убихинона и диметилменахинона) на NarI субъединицу [Rendon et al., 2015] цитоплазматической нитратредуктазы.

В процесс дыхания также вовлечена вторая цитоплазматическая нитратредуктаза NarZ, экспрессия которой не зависит от степени аэрации окружающей среды. Несмотря на крайне низкую активность NarZ [Stewart et al., 2002], предполагается, что ее функция заключается в поддержании нитрат-восстанавливающей функции при переходе от аэробных к анаэробным условиям [Bonnefoy et al., 1997; Iobbi et al., 1987]. Активность обеих редуктаз NarA и NarZ зависит от активного транспорта нитрата в цитоплазме. Поскольку продуктом восстановления нитрата является токсичный для клеток нитрит, то за его утилизацию отвечает высокоэффективная цитоплазматическая NirB редуктаза (рис. 6б).

Переключение между дыханием на нитрите за счет Nrf редуктазы при низких концентрациях нитрата в среде и дыханием на нитрате в условиях высокого

содержания нитрата осуществляется на уровне транскрипции субъединиц, входящих в ферментативные комплексы.

1.2.1. Основные регуляторы нитрат-нитритного метаболизма

Сложная система дыхательных цепей бактерий требует не менее сложно организованной регуляции, в том числе и на уровне экспрессии генов, кодирующих белки дыхательных комплексов. В ряде исследований было выяснено, что ключевую роль в данной регуляции играет наличие акцепторов электронов [Unden, Bongaerts, 1997]. Для бактерии более эффективным является использование акцепторов с наибольшим окислительно-восстановительным потенциалом, каковым является кислород [Cotter et al., 1990]. Поэтому в присутствии молекулярного кислорода в *E. coli* активируется транскрипция оперонов аэробных оксидоредуктаз. В отсутствие кислорода в среде происходит переключение с аэробного дыхания на анаэробное, основным регулятором которого является транскрипционный фактор (ТФ) Fnr [Unden, Schirawski, 1997].

В анаэробных условиях наиболее предпочтительными акцепторами являются нитрат и нитрит, при наличии которых в среде активируется транскрипция генов системы нитрат-нитритного дыхания [Wang et al., 2000], и происходит синтез соответствующих ферментов. При этом ингибируется синтез других терминальных редуктаз, таких как фумарат или ДМСО редуктазы [Billous, Weiner, 1985; Stewart, Berg, 1998]. Чувствительность к нитрату и нитриту в среде определяется сенсорными киназами NarQ и NarX, которые активируют соответствующие транскрипционные факторы NarP и NarL [Noriega et al., 2009].

Таким образом, у *E. coli* регуляция дыхания протекает согласно иерархическому принципу. Наибольшее влияние на уровень транскрипции, как правило, оказывает уровень аэрации окружающей среды. Следующей ступенью регуляции является ответ на присутствие в среде наиболее энергетически выгодного акцептора электронов, в то время как присутствие доноров электронов в среде практически не оказывает влияния на экспрессию генов комплексов дыхательных цепей.

Fnr (fumarate and nitrate reduction) транскрипционный фактор является активатором экспрессии *nap* [Darwin et al., 1998], *nar* [Li, DeMoss, 1988], *nrf* [Browning et al., 2005], *nir* [Jayaraman et al., 1988], *fdn* [Li, Stewart, 1992] и *fdhF*

[Salmon et al., 2003] оперонов, кодирующих структуру ферментов, вовлеченных в нитратный и нитритный метаболические пути: *NarP*, *NarG*, *Nrf* и *NirB* редуктазы и *Fdh-N* и *Fdh-H* дегидрогеназы соответственно.

Fnr относится к семейству CRP-подобных транскрипционных факторов, которые распознают ДНК-мотив спираль-поворот-спираль. Консенсусной последовательностью полусайта, распознаваемой транскрипционным фактором в форме димера, является AAA-ТТГАТ последовательность [Eigmeier et al., 1989]. С гена *fnr* транскрибируется мономер с молекулярной массой 30 kD, обладающий неспецифической способностью связываться с ДНК [Spiro, Guest, 1990]. Несмотря на то что концентрация димерной формы белка практически не зависит от внешних условий, только в анаэробных условиях он превращается из неактивной апоформы в активную, предполагающую наличие 4Fe–4S кластера [Dibden, Green, 2005; Green et al., 1996]. При переходе к аэробным условиям, при концентрации кислорода в среде, равной 1–5 мкМ, половина активных димерных молекул ТФ *Fnr* переходят в неактивную мономерную форму, содержащую кластер 2Fe–2S [Unden et al., 2002].

NarP и *NarL* (nitrate/nitrite response regulator) транскрипционные факторы осуществляют дифференциальную регуляцию уровня транскрипции *narP*, *nar*, *nrf*, *nir*, *fdhF* и *fdn* оперонов нитрат-нитритного метаболического пути [Wang et al., 1999; Wang, Gunsalus, 2000; 2003] таким образом, что при повышении концентрации субстрата происходит изменение соотношения активных форм ТФ *NarL* и *NarP* и переключение с респираторного пути на ассимиляционный [Wang, Gunsalus, 2000].

ТФ *NarP* принадлежит LuxR/UhpA семейству белков [Gross et al., 1989; Henikoff et al., 1990] и является частью двухкомпонентной системы *NarQ-NarP*, где *NarP* – транскрипционный фактор, а *NarQ* – сенсорная киназа. ТФ *NarL* так же входит в состав аналогичной *NarX-NarL* системы [Stewart 2003; Rabin, Stewart, 1993]. В присутствии нитрита происходит дифференциальное автофосфорилирование киназ *NarQ* и *NarX*, которые фосфорилируют *NarP* и *NarL* соответственно, так, что *NarP* становится основным фактором регуляции транскрипции, тогда как в присутствии нитрата этих различий не возникает, и оба фактора – *NarP* и *NarL* – активируются в одинаковой степени (рис. 7б) [Walker, DeMoss, 1993; Williams, Stewart 1997].

В отсутствие внешнего сигнала происходит специфичное дефосфорилирование активных транскрипционных факторов и их переход в неактивное состояние [Lee et al., 1999; Moreno-Vivian et al., 1999]. Таким образом, сложная система регуляции позволяет клетке различать сигналы от нитрата и нитрита [Ravcheev et al., 2005].

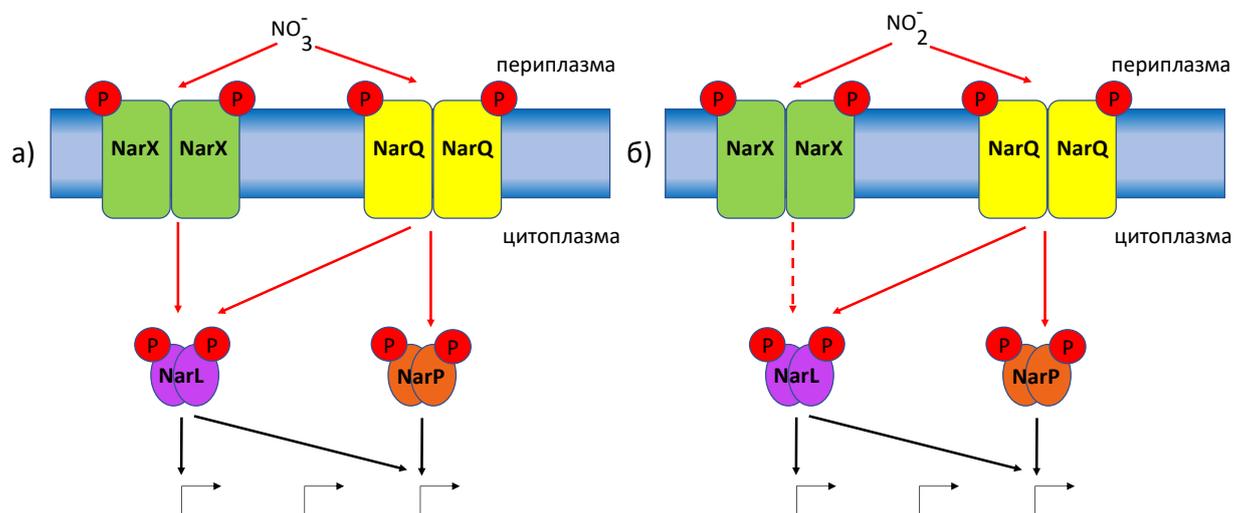


Рис. 7. Ответ клеток *E. coli* на присутствие в среде нитрата (а) и нитрита (б). Красными стрелками показаны процессы фосфорилирования (сплошные стрелки) и дефосфорилирования (пунктирная стрелка). Черными стрелками показаны процессы регуляции транскрипции.

Активный фосфорилированный ТФ NarL способен связываться как с сайтами NarP, так и со своими собственными, что автоматически делает NarP-регулон частью NarL-регулона (рис. 7а, б). Структура сайта связывания белка NarP хорошо известна. Она представляет собой инвертированный повтор длиной 16 п.н. с консенсусом TACSSWTNNAWSSGTA [Darwin et al., 1997]. Структура NarL-сайта более сложная и нет единого мнения о его строении. Согласно одной модели, NarL связывается с одиночными сайтами с консенсусом TACSSWT [Baikalov et al., 1996], по другой – его мотив не отличается от такового для NarP [Maris et al., 2002], по третьей – NarL связывается с повторами одиночных сайтов, находящихся на расстоянии 13–14 п.н. [Bearson et al., 2002]. Некоторые исследователи считают, что данный белок может связываться с любыми комбинациями одиночных сайтов [Darwin et al., 1997].

Далее будут рассмотрены в деталях структура и регуляция респираторного и ассимиляционного путей для нитрита.

1.2.2. Молекулярно-генетические механизмы регуляции экспрессии ферментов утилизации нитрита в клетке *E. coli*.

Формат-зависимая периплазматическая редуктаза Nrf нарабатывается при низких концентрациях нитрита в среде и осуществляет шестиэлектронный процесс восстановления нитрита до аммония согласно схеме

$\text{NO}_2^- + 6e^- + 8\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+ + 2\text{H}_2\text{O}$, а также пятиэлектронное восстановление субстрата до оксида азота NO. Активный комплекс фермента представляет из себя мультимер, состоящий из NrfA димеров, которые формируют каталитический центр, и NrfB димеров, переносящих электроны на NrfC и далее на NrfD мембран-связанную субъединицу. NrfA белок содержит четыре гем центра, связанных с CXXCH мотивом, и пятый гем, ассоциированный с CXXCK мотивом [Vamford et al., 2002]. Электроны с каталитического сайта переходят по цепочке гемов внутрь Nrf комплекса. Дальнейший путь передачи электронов с NrfA субъединицы неизвестен, однако Кларк и коллеги, основываясь на данных о структуре NrfB белка [Clarke et al., 2004], сделали предположение о том, что электроны передаются на цепочку из пяти гемов в составе NrfB димера, затем попадают на NrfC белок и, в конечном итоге, на NrfD субъединицу, которая обладает трансмембранным доменом, способным окислять восстановленный пул хинонов в клеточной мембране бактерии [Vamford et al., 2002; Clarke et al., 2008].

Все субъединицы кодируются одним опероном *nrf*, который активируется в анаэробных условиях через FNR транскрипционный фактор, центр сайта связывания которого расположен в -41.5 позиции от старта транскрипции (рис. 8). Промотор *nrf* оперона содержит три сайта посадки ТФ IHF и три сайта для транскрипционного фактора Fis, которые приводят к ингибированию транскрипции, если среда богата питательными веществами. Связывание IHF и Fis с сайтами в позиции -15 и -54 соответственно, репрессирует FNR-опосредованную транскрипцию, в то время как связывание IHF с сайтом III имеет положительное влияние на экспрессию. В ответ на присутствие нитрита (менее 2 мМ) и нитрата активируются факторы NarL и NarP, которые при низких концентрациях субстрата способны связываться с сайтом в области -74.5, вытесняя IHF с сайта IHF I, что приводит к максимальной экспрессии промотора. [Godfrey et al., 2017]. При повышении внеклеточной концентрации нитрита, более 2 мМ, NarL преимущественно связывается с сайтом в позиции -22,

что приводит к ингибированию транскрипции [Wang, Gunsalus, 2000] в присутствии высоких концентраций субстрата в среде. Нитрат имеет схожее действие через NarP и NarL факторы, однако для достижения активирующего или ингибирующего действия требуются меньшие концентрации субстрата.

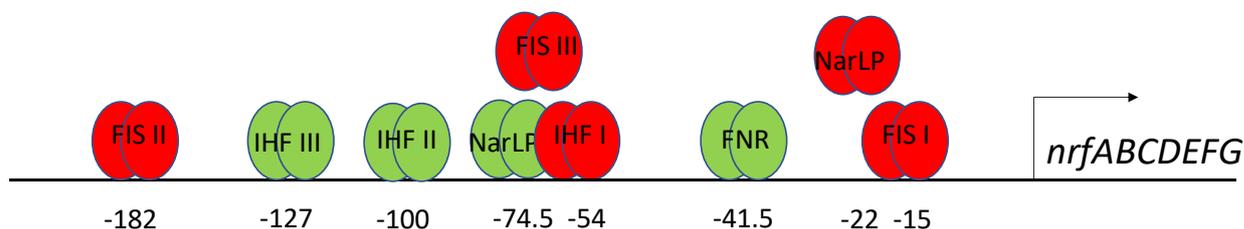


Рис. 8. Организация регуляторной области *nrf* оперона. Активирующее действие при посадке транскрипционного сайта на соответствующий сайт связывания показаны зеленым цветом, ингибирующее – красным. Снизу цифрами обозначены приблизительные координаты сайтов связывания соответствующих факторов относительно старта транскрипции

НАДН-зависимая нитритредуктаза NirB отвечает за внутриклеточную утилизацию нитрита. Она катализирует шестиэлектронное восстановление нитрита до аммония аналогично периплазматической нитритредуктазе по схеме $\text{NO}_2^- + 3\text{NADH}^+ + 5\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+ + 3\text{NAD}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$, но не способствует формированию мембранного потенциала [Jackson et al., 1981]. В отличие от периплазматической редуктазы NirB фермент является основным источником нитрит-утилизирующей активности в условиях повышенного содержания нитрата или нитрита в среде. Так, согласно данным [MacDonald et al., 1985; Page et al., 1990], вклад цитоплазматического фермента в нитрит-утилизирующую активность составляет 80–95%. Высокая активность NirB редуктазы объясняется тем, что нитрит и его побочные продукты метаболизма, попадая внутрь клеток, связываются с белками бактерий и вызывают цитотоксические эффекты [Tiso, Schechter, 2015], что требует высокой скорости утилизации нитрита внутри клетки в случае проникновения его из среды или наработки в результате активности нитратредуктазы NarG.

Фермент состоит из двух субъединиц NirB и NirD, в качестве простетических групп в субъединицах выступают молекулы FAD, гем, флавин и железо-серный комплекс [Jackson et al., 1981]. С оперона *nirBDC* нарабатываются четыре белка: NirB, NirD, cysG и NirC [Harborne et al., 1992, Warren et al., 1994]. Все белки, синтезируемые с данного оперона, в той или иной степени вовлечены в метаболизм нитрита. NirB и NirD входят в состав нитрит-восстанавливающего дегидрогеназного

комплекса, CysG участвует в синтезе железо-серосодержащей простетической группы NirB гидрогеназы, а мономеры NirC формируют транспортный комплекс, импортирующий нитрит в клетку для дальнейшей его утилизации НАДН-зависимой редуктазой. Стоит упомянуть, что в опероне также закодирована структура *nirE* нетранслируемого белка [Harborne et al., 1992].

Белки, относящиеся к ассимиляционному пути, кодируются единым *nirBDC* опероном, находящимся под строгим контролем транскрипционного фактора FNR, сайт посадки которого расположен в позиции -54 до -30 от старта транскрипции (рис. 9), т.е. экспрессия субъединиц цитоплазматической нитритредуктазы происходит исключительно в анаэробных условиях. Для оптимальной активации оперона *nirBDC* требуется высокая концентрация нитрита в среде [Jayaraman et al., 1988]. Максимальный уровень экспрессии оперона достигается в анаэробных условиях при добавлении более 2 мМ нитрата в среду, что определяется взаимодействием NarL фактора с двумя сайтами связывания в позициях -74 и -65 (рис. 9). При более низких концентрациях нитрата, меньше 1 мМ, с вышеуказанными сайтами взаимодействует преимущественно NarP фактор, который приводит к более слабой активации оперона по сравнению с транскрипционным фактором NarL. При концентрациях нитрата в промежуточных значениях (1 мМ – 2 мМ) эти сайты связывания могут быть заняты любым из двух факторов – NarL или NarP, что приводит к средней степени активации оперона.

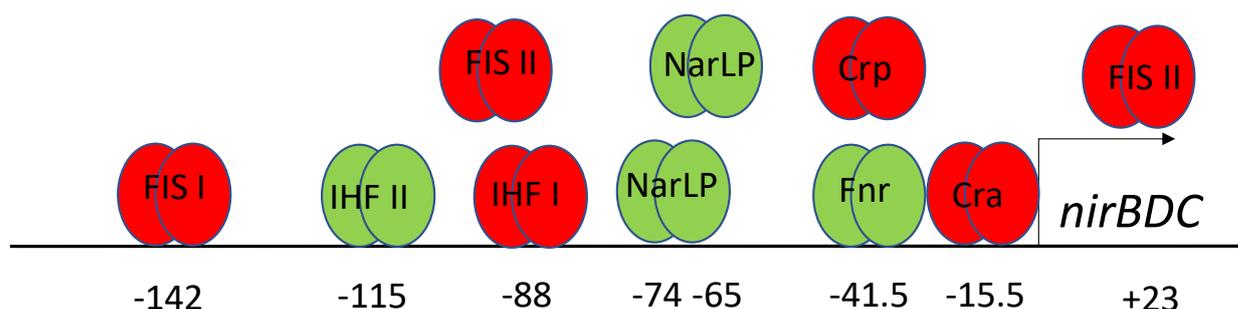


Рис. 9. Организация регуляторной области *nir* оперона. Активирующее действие при посадке транскрипционных факторов на соответствующие сайты связывания показано зеленым цветом, ингибирующее – красным. Снизу цифрами обозначены приблизительные координаты сайтов связывания соответствующих факторов относительно старта транскрипции.

Такой же механизм характерен и для нитрита, однако средний уровень транскрипции *nirBDC* оперона достигается при концентрации метаболита меньше 2.5 мМ, когда NarL и NarP факторы в равной доле могут быть связанными с

промоторной областью. Повышение концентрации индуктора в среде приводит к посадке NarL в позициях -74 и -65 и максимальному уровню экспрессии оперона в присутствии нитрита, который все же ниже по сравнению с тем эффектом, который вызывает нитрат [Wang, Gunsalus, 2000].

Транскрипционные факторы IHF и Fis ингибируют инициацию транскрипции *nir* оперона, создавая стерическое препятствие для посадки РНК-полимеразы при взаимодействии транскрипционных факторов со своими сайтами связывания, которые расположены на расстоянии -142, -97 и +23 для фактора Fis и -88 для фактора IHF от старта транскрипции [Wu et al., 1998; Browning et al., 2004, 2008].

При переходе клеток в стационарную фазу роста повышается концентрация IHF в цитоплазме [Ali et al., 1999], что приводит к связыванию фактора с сайтом в позиции -115 (IHF II) и повышению экспрессии оперона за счет отмены Fis-зависимого ингибирования IHF через IHF-I сайт. В присутствии нитрита или нитрата NarL связывается с сайтом, изменяя малую борозду ДНК, что затрудняет посадку IHF на ингибирующий сайт, и транскрипция повышается. Если же NarL уже связался с сайтом, то IHF не может вытеснить его, т.е. активация нитритом является первостепенной [Browning et al., 2004]. Ингибирующим действием обладают транскрипционные факторы H-NS, CRA и CRP [Browning et al., 2004; Zheng et al., 2004]. Связывание CRA с промоторной областью оперона возможно лишь в аэробных условиях, когда сайт посадки FNR, пересекающийся с сайтом посадки CRA, свободен. Несмотря на то что уровень таких транскрипционных факторов, как H-NS, CRA, CRP, IHF и Fis, определяется внешними условиями и фазой роста бактериальных клеток, нет никаких данных о зависимости уровня транскрипции *nir* оперона от скорости деления клеток [Browning et al., 2004].

Транспортная система нитрита. В условиях анаэробного дыхания на нитрите важная роль принадлежит транспортной системе, благодаря которой также контролируется содержание нитрита в клетке. Именно скоростью транспорта нитрита внутрь клетки определяется скорость работы цитоплазматической редуктазы NirB. Исследования Клегга и коллег [Clegg et al., 2002] показали, что по крайней мере три мембранных белка – NarK, NarU и NirC – вовлечены в процесс транспорта нитрита. Эксперименты на мутантах показывают, что оба белка NarK и NarU экспортируют нитрит, однако механизм их работы неизвестен. Согласно

первой модели транспорта [Clegg et al., 2002; Moir, Wood, 2001] NarK и, возможно, NarU представляют собой каналы, переносящие нитрит сам по себе. По второй модели белки работают по принципу антипортеров, т.е. выведение нитрита из клеток сопряжено с импортом нитрата [Jia, Cole, 2005; Bonnefoy et al., 1997; Clegg et al., 2002]. Поскольку большинство исследований было проведено с использованием нитрата в качестве источника нитрита, то невозможно точно определить механизм активного транспорта только для нитрита.

Были предприняты попытки выявить долю активности каждого из транспортеров в процессе транспорта нитрита на основании концентрации транспортеров в клетке [Clegg et al., 2002, Jia, Cole 2005; Jia et al., 2009]. Эти исследования показали, что в экспоненциальную фазу роста количество белка NarU на два порядка меньше, чем NarK. При переходе в стационарную фазу роста наработка NarU увеличивается, а синтез NarK, наоборот, уменьшается, хотя белок NarK все еще остается доминирующим по отношению к NarU [Jia, Cole, 2005]. Ряд исследований показал, что эффективность импорта нитрита через NirC в десять раз выше, чем через NarK или NarU в условиях культивирования клеток на нитрате [Clegg et al., 2002; Jia et al., 2009]. Данные о сопряженной активности генов, кодирующих структуру NirC транспортера и цитоплазматической NirB редуктазы, а также результаты экспериментов по измерению скорости цитоплазматической утилизации нитрита мутантами по генам, кодирующим различные транспортеры в условиях роста на глюкозе и нитрате [Jia et al., 2009], позволяют сделать предположение о главенствующей роли NirC белка в транспорте нитрита.

Поскольку гены, кодирующие структуру NirC транспортера и NirB нитритредуктазы, расположены в одном *nir* опероне, то молекулярно-генетические механизмы регуляции их синтеза аналогичны описанным выше для NirB.

1.2.3. Механизмы формирования цепи передачи электронов в условиях дыхания на нитрите

Респираторным ферментом, т.е. ферментом, участвующим в формировании цепи передачи электронов от донора к нитриту, является периплазматическая редуктаза Nrf. Она является формат-зависимой [Tyson et al., 1997] и функционирует в условиях низких концентраций нитрита [Wang, Gunsalus, 2000]. Формат синтезируется в процессе гликолиза и перерабатывается одной из трех

форматдегидрогеназ – Fdh-H, Fdh-N и Fdh-O. Все три фермента осуществляют окисление формата до углекислого газа и протона, однако функции белковых комплексов и условия, оптимальные для их работы, различны. Fdh-O дегидрогеназа не подвержена регуляции со стороны кислорода и синтезируется на постоянно низком уровне [Abaibou et al., 1995]. Ее вклад в Nrf активность, оцененный по нитрит-утилизирующей активности мутантов по генам, кодирующим структурные элементы Fdh-O фермента, составляет не более 10% [Darwin et al., 1993]. Таким образом, основная часть потока электронов может проходить по одному из трех путей: только через Fdh-N, через Fdh-H, или через оба фермента.

Ранее считалось, что основным донором для Nrf редуктазы является Fdh-N форматдегидрогеназа [Abou-Jaoudé et al., 1979] по аналогии с нитратопосредованной цепью переноса электронов [Darwin et al., 1993]. Механизм возникновения мембранного потенциала с использованием нитрата в качестве акцептора хорошо изучен [Jormakka et al., 2002]. Дыхательная цепь с нитратом в качестве акцептора состоит из Fdh-N форматдегидрогеназы, которая окисляет формат в периплазме и передает два полученных электрона и два протона из цитоплазмы на молекулы менахинона, которые, в свою очередь, связываются с мембран-связанной Nar нитратредуктазой, восстанавливающей цитоплазматический нитрат, причем два протона с восстановленного менахинона выводятся в периплазму [Jormakka et al., 2002] (рис. 4б).

Исследования скорости утилизации нитрита на формате у мутантов по генам *fdn* оперона, кодирующего Fdh-N субъединицы, показали, что скорость формат-зависимой утилизации нитрита Nrf редуктазой снижается не более, чем на 50% по сравнению с диким типом, содержащим все три форматдегидрогеназы [Darwin et al., 1993]. Это дает основание предполагать, что существует дополнительный механизм переноса электронов на нитрит, отличный от Fdh-O и Fdh-N.

Исследования, проведенные Вангом с коллегами [Wang, Gunsalus, 2003], показали, что в условиях дыхания на нитрите уровень экспрессии *fdn* оперона ниже по сравнению с уровнем экспрессии гена *fdhF*, кодирующего структуру третьей форматдегидрогеназы Fdh-H. Кроме того, авторы выявили, что профиль экспрессии гена *fdhF*, в зависимости от нитрита, совпадает с таковым для *nrf* оперона, кодирующего структуру Nrf нитритредуктазы в условиях проточного

культивирования бактерий, что позволило Вангу с коллегами [Wang, Gunsalus, 2003] сделать вывод о возможном участии Fdh-H дегидрогеназы в цепи передачи электронов с формата на нитрит. Однако механизм передачи остался неизвестен.

Fdh-H редуктаза входит в состав FHL форматгидрогенлиазного комплекса [Axley et al., 1990] наряду с гидрогеназой Hyd-3. FHL считается основным ферментом переработки формата в условиях ферментации, т.е. в отсутствие электронных акцепторов, в том числе и нитрита [Sawers et al., 2004]. Несмотря на достоверные факты, подтверждающие участие Fdh-H в процессах дыхания, в структуре субъединиц, входящих в состав FHL комплекса, не обнаружены сайты связывания с любым типом хинонов, в отличие от двух других дегидрогеназ: Fdh-N и Fdh-O [Axley et al., 1990, Abaibou et al., 1995]. Механизм формирования протонного потенциала в условиях ферментации происходит без участия хинонов, а только за счет расхода протонов от муравьиной кислоты (продукт формата и протона) и превращения ее в водород, при этом не происходит формирования цепи переноса электронов. В отсутствие связи форматдегидрогеназы и нитритредуктазы через молекулы хинонов, формирование дыхательной цепи напрямую невозможно, что означает либо не прямое участие Fdh-H в составе FHL комплекса в процессе формирования дыхательной цепи с нитритом, либо в условиях дыхания на нитрите Fdh-H входит в состав другого комплекса. В подтверждение последней гипотезы выступают данные о существовании у *E. coli* альтернативного состава FHL гидрогенлиазного комплекса, в котором вместо гидрогеназы Hyd-3 присутствует гидрогеназа Hyd-4, синтез субъединиц которой с мРНК оперона *huf* ранее считался крайне низким [Self et al., 2004]. Дальнейшие исследования показали, что оптимальным условием наработки гидрогеназы Hyd-4 является кислый pH окружающей среды [Bagratyan et al., 2002; Mnatsakanyan et al., 2004]. Особенности структурной организации Hyd-4 гидрогеназы, входящей в состав FHL-2 комплекса позволили Эндрюсу и коллегам [Andrews et al., 1997] предположить наличие у нее прямой протон-транслоцирующей активности [Andrews et al., 1997; Skibinski et al., 2002; Efremov, Sazanov, 2012] и способности связываться с хинонами. Таким образом, Эндрюс, а затем и другие авторы, сделали вывод о том, что малоизученный на сегодняшний момент FHL-2 комплекс может быть источником электронов для периплазматической нитритредуктазы в условиях пониженного pH среды.

1.3. Tat система транспорта белков в периплазму

Ферментативные комплексы, участвующие в анаэробном дыхании, такие как гидрогеназы, форматдегидрогеназы, ТМАО и DMSO редуктазы, нитрат и нитритредуктазы, которые локализуются в периплазматическом пространстве клетки, используют для переноса субъединиц ферментов через мембрану систему Tat транспорта (twin-arginine translocation), которая широко распространена среди представителей архей, бактерий и растений [Price, Driessen, 2010]. Этот процесс, происходящий в периплазме, важен с точки зрения дальнейшей сборки белков в активные ферментативные комплексы. Схема основных этапов процесса транспорта белков из цитоплазмы в периплазму представлена на рис. 10.

Перенос белка осуществляется за счет наличия сигнала из двух смежных аргининовых остатков в секреторном пептиде. Считается, что среди всех периплазматических белков *E. coli*, около 6% секретируются в периплазму посредством Tat зависимого механизма.

В большинстве случаев транспортируемый белок состоит из трех доменов: положительно заряженного N-терминального (или n-района), гидрофобного (h-района) и C-терминального (c-района). На стыке n- и h-районов расположена консервативная последовательность аминокислот Ser/Thr-Arg-Arg-X-Phe-Leu-Lys (где X – любая полярная аминокислота). Сигнальная последовательность распознается Tat белками, которые осуществляют транспорт. Исключением из этого правила является “механизм автостопа”, показанный для восьми белков *E. coli*, в частности, белков, входящих в комплексы гидрогеназ Hyd-1 и Hyd-2 [Rodrigue et al., 1999] и форматдегидрогеназы Fdh-N [Stanley et al., 2002; Lee et al., 2006]. Суть данного механизма заключается в транспорте белка совместно с другими белками, содержащими необходимую последовательность [Lee et al., 2006]. «Механизм автостопа» был детально изучен на примере гидрогеназы Hyd-2, кодируемой *hnb* опероном. Субъединицы HnbO и HnbC гидрогеназы Hyd-2 обогащаются кофакторами Fe-S и Ni-Fe-CO-2CN с участием HnbG белка, при этом HnbE белок маскирует Tat сигнальную последовательность для предотвращения транспорта, пока кофакторы не присоединятся. Далее формируется комплекс из шаперона HnbE и HnbO белка, содержащего Tat сигнальную последовательность, и HnbC, не обладающего данной последовательностью. Готовые комплексы, за счет

содержания нужной последовательности в HybC, уже могут переноситься через пору, состоящую из белков TatA, TatB, TatC и TatE. Одновременно с этим блокируется экспорт мономерных несвязанных форм. В периплазме HybOC комплекс связывается через субъединицу HybA с интегральной мембранной субъединицей HybB [Lee et al., 2006].

В более распространенном случае, когда сигнальная последовательность Tat системы присутствует на всех необходимых субъединицах комплекса, Tat транспортируемые белки связываются с шаперонами для предотвращения транспорта через Sec транспортный путь [Cristobal et al., 1999] (рис. 10а), далее белки упаковываются и связываются с кофакторами (рис. 10б) при участии шаперонов широкого спектра действия, таких как DnaK и SlyD [Lee et al., 2006]. В цитоплазме белок TatD участвует в проверке качества соединения белка с кофактором, если кофактор отсутствует, TatD участвует в деградации транспортируемого белка [Lee et al., 2006]. На примере NrfC и NapG, Матос и коллеги [Matos et al., 2009] показали, что белки, у которых отсутствует необходимый Fe-S кластер, быстро деградируют.

Укомплектованные кофакторами белки переносятся с участием TatA, TatB, и TatC, составляющих пору (рис. 10в, г, д). Белки Tat системы образуют поровый канал, состоящий из различных по составу и количеству белковых комплексов. Такой модульный принцип позволяет переносить различные по размеру белки, и в то же время адаптирует размер формируемого канала под величину транспортируемого белка или комплекса, что препятствует ионной утечке через слишком большие по размеру поры. TatA и TatC белки формируют минимальный по составу и размеру поровый комплекс [Blaudeck et al., 2005] (рис. 10д). Для транспорта больших по размеру пептидов формируется более сложная по составу пора (рис. 10г). На первом этапе транспорта TatB распознает транспортируемый белок (рис. 10в) и осуществляет связь с порой, которая состоит преимущественно из TatA белка (рис. 10д) и небольшого количества TatC. Формирование неэквивалентного комплекса происходит, потому что синтез белка TatA выше, чем синтез всех остальных белков Tat системы, несмотря на то что все белки нарабатываются на постоянном уровне с одного оперона *tatABCD* [Jack et al., 2001].

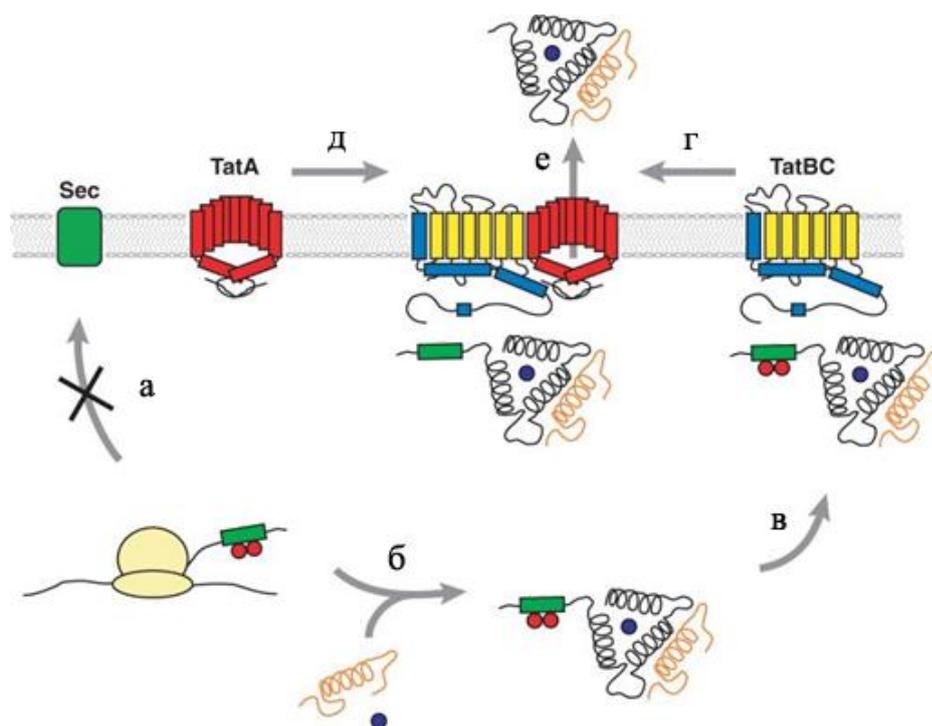


Рис. 10. Транспорт белков с использованием Tat системы. Мембранные белки TatA, TatB и TatC обозначены красным, синим и желтым цветами соответственно. Tat сигнальная последовательность транспортируемого белка обозначена зеленым прямоугольником. (а) – процесс связывания белка с шаперонами (красные круги) для препятствия транспорта через Sec транспортный путь, (б) – обогащение белков кофактором (синий круг) и (в) – образование комплекса белка с TatBC рецепторным комплексом. (г, д) – формирование поры и транспорт белка, (е) – отщепление сигнальной последовательности и выведение белка в периплазму.

На втором этапе транспортируемый пептид передается на TatBC комплекс. В данном транспортном комплексе С-конец TatB связан с N-концом TatC белка таким образом, что в Tat комплексах белки представлены в эквимольных количествах, но во множественных копиях. В поровом комплексе также был обнаружен TatE белок, связанный со всеми остальными белками, но в большей степени с TatA. Согласно исследованию Эймера и коллег, TatE участвует в транспорте по неизвестному механизму, несмотря на то что его содержание приблизительно в пятьдесят раз меньше, чем TatA [Eimer et al., 2015]. На заключительной стадии Tat сигнальная последовательность транспортируемого белка отщепляется сигнальной пептидазой I, и целевой белок высвобождается в периплазматическое пространство [Lee et al., 2006] (рис. 10е).

1.4. Пути утилизации нитрита различными видами бактерий

Нитрит является одной из компонент в цикле превращения бактериями азотосодержащих веществ. В ходе процессов нитрификации происходит окисление аммония до нитрита бактериями рода *Nitrosomonas*, далее нитрит окисляется до нитрата другими бактериями из рода *Nitrobacter* [Yao, Peng, 2017]. Противоположным по направлению является путь аммонификации, в котором нитрат восстанавливается до нитрита одной из трех нитратредуктаз: ассимиляционной *Nas* (найденной у представителей рода *Klebsiella*, но отсутствующей у *E. coli*), респираторной *Nar* или периплазматической диссимиляционной *Nap* (рис. 11). В дальнейшем нитрит претерпевает превращение до аммония по одному из трех путей, два из которых относятся к ассимиляционному пути, а один – к денитрификации. Первый путь – респираторная аммонификация, которая осуществляется периплазматическим дыхательным ферментом *Nrf*, синтезируемым у *E. coli* и у ряда других бактерий. Второй путь – ассимиляционный, реализуемый за счет цитоплазматической *Nir* редуктазы, присутствующей в большинстве видов семейства *Enterobacteraceae*, или за счет *Nrf* фермента, который восстанавливает нитрит до оксида азота. Третий путь – денитрификация, в которой нитрит восстанавливается до монооксида азота (NO), который превращается в закись азота (N_2O), и конечным продуктом служит азот. Цепочку превращений осуществляют ферменты *NirK* (или *NirS*), *NorB* и *NosZ* [Rodionov et al., 2005, Arp et al., 2002].

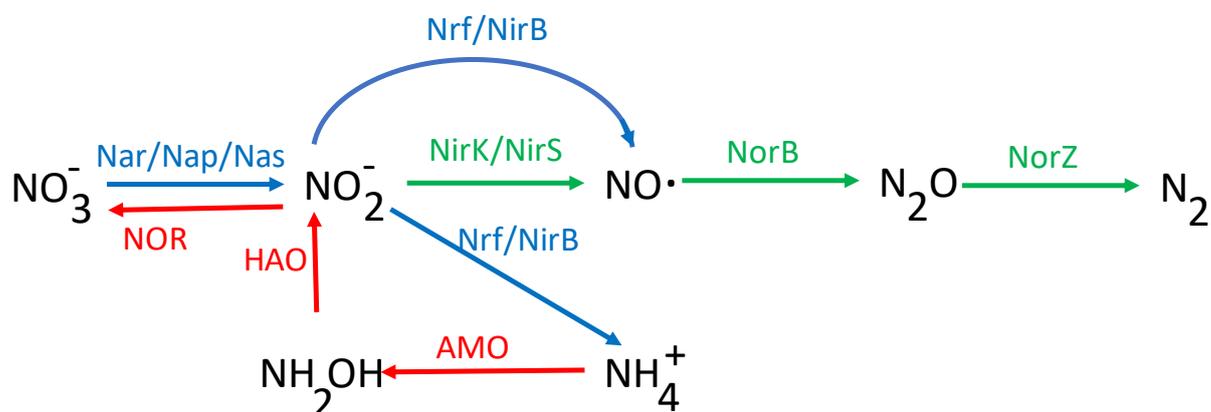


Рис. 11. Процессы, связанные с синтезом и утилизацией нитрита для различных бактерий. Процессы аммонификации, денитрификации и нитрификации показаны синим, зеленым и красным цветами соответственно. Названия ферментов, осуществляющих реакции, указаны над стрелками.

Процессы респираторной аммонификации относятся к одному из древних путей в цикле превращения азотосодержащих соединений [Klotz, Stein, 2008], и поэтому этот метаболический путь характерен для представителей различных родов из типа протеобактерий. Особенно часто путь респираторной аммонификации можно встретить у патогенных представителей, поскольку наличие данного пути дает ряд энергетических преимуществ и облегчает заселение организма хозяина [Weingarten et al., 2008]. Стоит отметить, что встречаются и непатогенные виды, способные к аммонификации. Этот путь был обнаружен в бактерии *Wolinella succinogene* из ϵ -протеобактерий [Simon, Kern, 2009], для которой был выявлен самый быстрый рост на смеси формата и нитрита. Для этой бактерии накоплено большое количество информации о генах, вовлеченных в цепь передачи электронов на нитрит, о транскрибируемых белках и формируемых белковых комплексах, а также о структуре дыхательной цепи. В то же время, данные по другим бактериям, как правило, не настолько обширны. Общей характеристикой для бактерий, осуществляющих утилизацию нитрита через аммонификацию, является синтез менахинона (или диметилменахинона) и периплазматической нитритредуктазы Nrf в анаэробных условиях. Изучение аминокислотных последовательностей субъединиц Nrf показало, что имеются различия в составе ферментов среди протеобактерий. Для представителей δ - и ϵ -протеобактерий, таких как *Wolinella succinogenes* и *Sulfurospirillum deleyianum*, характерно наличие мембран-связывающего белка NrfH, функция которого сводится не только к прикреплению ферментативного комплекса к мембране, но и к приему электронов с пула восстановленных менахинонов. Для представителей γ -протеобактерий, таких как *Escherichia coli* и *Salmonella enterica*, перенос электронов к каталитической NrfA субъединице осуществляет белок NrfB, а закрепление на мембране и связь с хинолами осуществляет NrfD субъединица [Clarke et al., 2007; 2008]. Если акцептором электронов служит нитрит, донорами электронов для разных бактерий могут выступать формат, водород или сульфид [Simon, 2002].

Для единичных представителей α -протеобактерий (*Sphigomonas sp.*) [Jiménez et al., 2012] и β -протеобактерий (*Neisseria meningitidis*) [Sparacino-Watkins et al., 2014] были выявлены гены, гомологичные цитоплазматической редуктазе NirB, и не были найдены гены, кодирующие респираторную Nrf редуктазу. Тем не менее для

большинства остальных представителей α - и β -протеобактерий более характерно наличие процессов денитрификации, в которых нитрит превращается в оксид азота с помощью NirK редуктазы [Helen et al., 2016]. Альтернативным вариантом состава метаболического пути утилизации нитрита является наличие периплазматической редуктазы и отсутствие цитоплазматической редуктазы. Такой вариант был показан для отдельных представителей класса ϵ -протеобактерий (*Haemophilus influenzae*, *Helicobacter hepaticus*, *Campylobacter jejuni*) [Sparacino-Watkins et al., 2014] и δ -протеобактерий (*Geobacter metallireducens*) [Chovanec et al., 2012]. Бактерии, содержащие обе редуктазы, чаще встречаются среди γ -протеобактерий (*E. coli*, *S. enetica*, *Shigella dysenteriae*), однако встречаются и виды бактерий, содержащие одну из редуктаз: только респираторную (*Haemophilus influenzae*, *Vibrio fischeri*) [Harrington et al., 2009; Liu et al., 1988] или только цитоплазматическую (*Yersinia pestis*, *Klebsiella pneumoniae*) [Sparacino-Watkins et al., 2014; Lin et al., 1993].

Исследования особенностей геномов γ -протеобактерий показало взаимосвязь между наличием одной или двух нитритредуктаз и составом регуляторного аппарата. В геномах бактерий, содержащих как периплазматическую, так и цитоплазматическую нитритредуктазы, были найдены NarX-NarL и NarQ-NarP регуляторные системы. В бактериях, где присутствует лишь периплазматическая редуктаза, обнаружена лишь одна регуляторная система NarX-NarL [Ravcheev et al., 2005].

Для бактерии *E. coli* характерна избыточность состава метаболических путей. Это правило распространяется и на процессы утилизации нитрита, в которых присутствуют три форматдегидрогеназы (Fdh-N, Fdh-O и Fdh-H), три нитратредуктазы (Nar, Nar и NarZ) и две нитритредуктазы (Nrf и NirB). Поскольку нитрит токсичен, то более безопасным путем для получения энергии для клеток было бы использование периплазматических редуктаз и образование мембранного потенциала за счет Nrf нитритредуктазы. Однако у *E. coli* существует еще один путь, приводящий не только к синтезу большего количества АТФ, но и внутриклеточного нитрита, требующего, в связи с этим работы целого аппарата транспорта и выведения токсического нитрита, а также его утилизации внутри клетки через NirB редуктазу.

Наличие двух путей утилизации нитрата позволяет *E. coli* максимально эффективно утилизировать субстрат, если он присутствует в среде, а также получать энергию, используя нитрит. При низких концентрациях нитрата или нитрита, цепь переноса электронов формируется с периплазматической Nrf редуктазой, а при высоком уровне нитрата в цепи участвует мембран-связанная Nar редуктаза (рис. 6а, б). Во всех трех случаях формируются различные варианты дыхательной цепи, что приводит к образованию мембранного потенциала, а значит к наработке энергии в виде АТФ.

Ранее считалось, что роль NirB сводится только к утилизации нитрита, который синтезируется в клетке из нитрата Nar редуктазой [Ravcheev et al., 2005]. В условиях роста клеток на нитрите (внешний нитрит) такого накопления внутриклеточного нитрита не может быть, а значит, нет необходимости в NirB-опосредованной активности. Также нет видимых причин для чего бактериальной клетке нужно набирать целый комплекс белков для закачивания больших концентраций токсичного субстрата внутрь клетки, для которого нет внутриклеточных механизмов его использования для наработки энергии. Тем не менее этот механизм сопряженной активности NirB нитритредуктазы и NirC транспортного белка для нитрита существует и реализован через структуру *nirBC* оперона с единой регуляцией для генов, кодирующих структуру NirB и NirC белков. Не исключено, что этот метаболический путь имеет другое назначение. Одним из возможных объяснений может быть использование клетками *E. coli* аммония, являющегося продуктом переработки нитрита, для биосинтеза аминокислот [Kaldorf et al., 1993].

1.5. Математическое моделирование процессов клеточного дыхания

Пластичность метаболизма *E. coli* и большой объем экспериментальных данных о механизмах ее функционирования делает *E. coli* подходящим объектом для изучения сложных взаимосвязей между структурно-функциональной организацией метаболических и молекулярно-генетических процессов и их динамическими свойствами. Основным методом исследования динамики функционирования метаболических и генных сетей является моделирование.

Математическая модель позволяет описывать взаимоотношения всех элементов метаболической системы с привлечением стехиометрических данных и знаний о регуляторных контурах, а также исследовать особенности их функционирования, что важно для решения как теоретических, так и практических задач. Среди них можно выделить задачу прогноза поведения метаболической системы в неисследованных ранее условиях, а также исследование влияния мутаций тех или иных компонентов системы на динамику ее функционирования, включая выход конечного продукта, что находит применение в биоинженерии и производстве биологически активных веществ.

Рассмотрим более подробно существующие математические модели респираторных процессов и полученные с их помощью новые знания.

1.5.1. Потокные модели

Метод анализа метаболических потоков (Flux Balance Analysis - FBA) в условиях достижения системой стационара позволяет описывать большие по объему системы и анализировать влияние различных факторов как внешних, так и внутренних, на метаболизм системы (клетки) в целом, в том числе и при изменении генетической составляющей системы в результате мутаций тех или иных ее компонентов.

Данные о метаболических реакциях формулируются в стехиометрические матрицы (S) размера $m \times n$, где m – количество рассматриваемых метаболитов, а n – количество реакций. Значения в каждой колонке соответствуют стехиометрическим коэффициентам метаболитов, участвующих в реакции. При этом коэффициент отрицательный, если метаболит расходуется в реакции, положительный – если вещество является продуктом, и равен нулю – если метаболит не участвует в реакции. Поскольку в каждой реакции участвует только ограниченное число метаболитов, то матрица S является разреженной.

Для каждой реакции выписывается вектор скоростей потоков V длины n , каждый элемент которого представляет собой скорость образования или потребления метаболита, и вектор стационарных концентраций (вектор X) всех метаболитов длины m . Метод FBA рассматривает реакции в условиях стационара ($dX/dt=0$), что позволяет записать систему алгебраических уравнений $SV=0$. В таких системах, как правило, $m < n$, то есть мы имеем дело с недоопределенной системой,

имеющей бесконечное множество решений. Тем не менее, решение можно получить, если ввести ограничения на значения потоков и сформулировать задачу для метода линейного программирования [Orth et al., 2010]. Для этого выписывается функционал $Z=c^TV$, который представляет собой линейную комбинацию скоростей потоков с соответствующими весами c . В простейшем примере c представляет собой вектор, состоящий из нулей и одного ненулевого элемента, который показывает какое целевое вещество необходимо максимально наработать. В более сложном случае, как например, максимизирование функции, характеризующей клеточную биомассу, функционал представляет собой сумму произведений скоростей потоков метаболитов, необходимых для роста и деления клеток, коэффициенты для которых измерены экспериментально [Varma, Palsson, 1993].

Метод потокового моделирования был использован Палссоном и коллегами [Varma et al., 1993; Schilling et al., 1999; Edwards, Palsson, 2000; Edwards et al., 2001, Reed et al., 2003; Reed, Palsson, 2003] для моделирования основных клеточных процессов у *E. coli*, в которых подмодели процессов дыхания отражали энергетическое состояние клетки в аэробных условиях, а также этот метод применялся рядом других авторов для создания менее масштабных метаболических моделей бактериальных клеток [Majewski, Domach, 1990; Kim et al., 2008; Weaver et al., 2014; Henkel et al., 2014]. Так, Мажевски и Домач [Majewski, Domach 1990] в своем исследовании показали, что синтез и выделение ацетата происходит в результате дисбаланса метаболических потоков при ингибировании цикла Кребса. Хенкель и коллеги [Henkel et al., 2014] с помощью потоковой модели, описывающей функционирование дыхательной цепи, составленной из обобщенных дегидрогеназ и акцепторов, показали, что именно концентрация убихинона, а не его восстановленной формы убихинола, определяет активность ArcBA транскрипционного фактора в условиях ограничения роста культуры по уровню глюкозы в хемостате в микроаэробных условиях.

С помощью данного подхода были исследованы процессы дыхания у фотосинтезирующих пурпурных бактерий *Rhodospirillaceae*. Клэнт и коллеги [Klamt et al., 2008] разработали небольшую по размеру потоковую модель, описывающую семь реакций фотосинтеза в анаэробных условиях на свету и дыхания в аэробных условиях. Оба процесса приводят к возникновению мембранного потенциала и

синтезу АТФ. Анализ модели показал, что соотношение восстановленного убихинона к окисленному является важным показателем в регуляции процессов дыхания и фотосинтеза наряду с уровнем кислорода и степенью освещенности.

Потоковые модели были использованы и для анализа респираторных процессов в клетках эукариот, которые протекают в митохондриях. В частности, с их помощью были исследованы респираторные механизмы здоровых и опухолевых клеток. Еще в 20-е годы был открыт эффект, который получил название «эффект Варбурга» [Warburg, 1924]. Его суть в том, что здоровые клетки для получения энергии используют процессы дыхания, протекающие в митохондриях, а опухолевые клетки для синтеза АТФ используют гликолиз, приводящий к синтезу лактата. Численный анализ моделей показал преимущество гликолиза для быстрого деления раковых клеток в условиях повышенного потребления глюкозы [Vazquez et al., 2010; Schuster et al., 2015] и позволил обосновать причину перехода клеток к непрерывно делящемуся состоянию.

Однако этот подход имеет ограниченное применение и не позволяет выявить внутренние механизмы, лежащие в основе конкретного динамического поведения биологической системы, поскольку реальные метаболические системы функционируют в неравновесных условиях.

1.5.2. Динамические модели

Если целью исследования является выявление механизмов, определяющих функционирование системы, то для анализа используются динамические модели. Переменными в таких моделях выступают концентрации метаболитов и белков, скорость изменения которых во времени описывается системой обыкновенных дифференциальных уравнений. Таким образом, каждая химическая реакция или процесс однозначно определяются списком переменных – субстратов, продуктов и регуляторов, и законом, согласно которому описывается скорость протекания реакции, а также набором параметров.

Высокий уровень детализации описания процессов, происходящих в биологических объектах, с одной стороны, позволяет делать более точные предсказания, объясняющие поведение системы, и выявлять ключевые механизмы, влияющие на динамические свойства, с другой стороны, приводит к большому числу

параметров и переменных модели, что требует большого количества экспериментальных данных для адаптации модели. Например, процессы, относящиеся к центральному метаболизму бактерии *E. coli*, хорошо изучены, и для них получены данные как по структурным и кинетическим характеристикам ферментов, так и по концентрациям метаболитов, что позволило создать кинетические модели, наиболее значимые из которых будут рассмотрены далее. И все же такая высокая степень изученности – это скорее исключение из правил. Однако даже в отсутствие некоторых структурных данных существует возможность исследовать поведение системы, основываясь на фрагментарных экспериментальных данных. В таких случаях при разделении общей системы на отдельные подпроцессы учитывается имеющееся количество структурных и кинетических данных. Для отдельных процессов с высоким уровнем степени изученности можно, во-первых, применить неравновесный подход, при котором описывается каждый отдельный биохимический процесс, во-вторых, для упрощения системы использовать квазистационарный подход, в котором биохимическая модель рассматривается в квазистационарном виде [Системная компьютерная биология, 2008]. В отсутствие данных о механизмах рассматриваемого процесса или отдельных его стадий для описания используются аппроксимирующие функции из класса обобщенных функций Хилла, представляющих собой рациональный полином.

Впервые в биологии подобного вида функции были использованы Хиллом, который использовал степенную функцию вида $f(x) = \frac{k}{1+x^n}$ для описания кинетики процесса соединения кислорода с молекулой гемоглобина. Необходимость применения степенной функции в данном случае связано с нелинейным характером протекания процесса, вызванным кооперативным эффектом присоединения молекул кислорода к гему, т.е. присоединение к тетрамерной форме гема одной молекулы кислорода облегчает присоединение следующих. Значение параметра степенной функции n для гемоглобина на основании экспериментальных данных было определено равным 2.8. [Биохимия, 1984] Данный вид функций зачастую используется для описания кинетики взаимодействия рецептора с лигандом [Santillan, 2008].

Общий вид обобщенных функций Хилла, описывающих биологические процессы, был разработан в институте Цитологии и Генетики. Данный вид функций наиболее часто используется для моделирования регуляции транскрипции. Этот подход обладает универсальностью и может быть использован для разработки моделей молекулярно-генетических систем произвольных типов клетки [Системная компьютерная биология, 2008], поскольку позволяет описать практически любую форму экспериментальной кривой. Общий вид функций выглядит следующим образом:

$$h(x|x \in X) = \frac{\sum_{\alpha} \delta_{\alpha} \prod_{x \in X_{\alpha}} \left(\frac{x}{k_{\alpha}}\right)^{n_{\alpha,x}}}{\sum_{\alpha} \prod_{x \in X_{\alpha}} \left(\frac{x}{k_{\alpha}}\right)^{n_{\alpha,x}}},$$

где x – множество переменных, $A = \{\alpha\}$ – множество индексов, которыми нумеруются элементы некоторого подмножества всех подмножеств множества X : $\aleph = \{X_{\alpha} : X_{\alpha} \subseteq X, \alpha \in A\}$. Через K , N , Δ обозначаются множества положительных по значению параметров, называемых коэффициентами эффективности, хилловскими коэффициентами и коэффициентами активности соответственно: $\{k_{\alpha} : \alpha \in A\} = K$, $\{n_{\alpha,x} : x \in X_{\alpha}, \alpha \in A\} = N$, $\{\delta_{\alpha} : \alpha \in A\} = \Delta$ [Likhoshvai, Ratushny, 2007].

Использование обобщенной функции Хилла предоставляет большие возможности при моделировании динамики функционирования системы при недостаточно изученных механизмах протекания процессов или их регуляции, а также обобщенная функция Хилла является не менее мощным инструментом для упрощения моделирования в условиях известного механизма, когда детальное описание подсистемы неважно для моделирования полной системы. В качестве примера приведем случай моделирования процесса изменения уровня транскрипции в ответ на внешний стимул. Распространенным случаем является регуляция посредством работы целой сети белковых молекул, часть из которых реагируют на внешний стимул и передают дальше сигнал на транскрипционные факторы. Вместо описания всех стадий процесса системой биохимических взаимодействий, наиболее простым путем будет описать уровень транскрипции через обобщенную функцию Хилла, переменной в которой выступает концентрация внешнего сигнала, что позволяет редуцировать систему и снизить количество параметров и переменных системы. Подобный подход был использован для моделирования относительного уровня транскрипции оперонов *cydAB* и *cyoABCDE* от уровня кислорода, а также

экспрессии гена *purC* в зависимости от концентраций метаболитов GTP и CTP [Системная компьютерная биология, 2008].

Несмотря на то что обобщенная функция Хилла позволяет лишь в общих чертах описать механизмы регуляции транскрипции генов, тем не менее данный подход позволяет проверить ряд гипотез об общих регуляторных механизмах и сделать прогноз относительно наиболее вероятного. Например, в работе [Хлебодарова и др., 2015] были реконструированы различные варианты молекулярно-генетического механизма регуляции экспрессии гена *dps* *E. coli* внешним регулятором – кадмием, и был выбран наиболее вероятный вариант регуляции через неконкурентное взаимодействие трех транскрипционных факторов, определенных на основании литературных данных

Стоит отметить, что процесс создания электронной клетки даже для такого изученного модельного организма как *E. coli* сопряжен с большим количеством сложностей. Поэтому на сегодняшний день так мало больших по размеру кинетических моделей, описывающих обширные метаболические процессы. Одной из таких моделей является модель центрального метаболизма *E. coli*, разработанная Маннаном и коллегами [Mannan et al., 2015], в основу которой заложено достаточно много экспериментальных данных, включая и “мультиомные” исследования. Основываясь на численных результатах моделирования, авторы показали возможность существования двух различных популяций бактерий *E. coli*, одна из которых для получения энергии потребляла глюкозу, а другая использовала ацетат.

В 2006 году Пирси и коллеги [Peercy et al., 2006] разработали кинетическую модель аэробной дыхательной цепи *E. coli* и с ее помощью исследовали молекулярно-генетические механизмы регуляции экспрессии цитохромоксидазы глобальными транскрипционными факторами – Fnr и ArcA. Авторы продемонстрировали возможность сложных динамических режимов изменения концентраций цитохрома, таких как осцилляции и гистерезис, в зависимости от концентрации кислорода.

В лаборатории теоретической генетики ИЦиГ СО РАН были разработаны модели, с помощью которых были исследованы механизмы регуляции отдельных компонентов респираторной цепи *E. coli*. В частности, была исследована зависимость активности АТФ-синтазы от концентрации таких метаболитов, как

натрий, калий и магний [Khlebodarova et al., 2006], и, как было указано ранее, была исследована динамика функционирования *cydAB* и *cyoABCDE* оперонов, кодирующих структуру двух терминальных оксидаз *bd* и *bo*, в зависимости от уровня внеклеточного кислорода, выступающего, таким образом, регулятором транскрипции ферментов. [Ratushny, Khlebodarova, 2006; Likhoshvai, Ratushny, 2006]. В этих моделях учитывалось строение регуляторных областей оперонов, кодирующих цитохромоксидазы, а для адаптации моделей были использованы данные по активности оперонов у мутантов с делециями по генам *fnr* и *arcA*, кодирующих структуру транскрипционных факторов Fnr и ArcA. Для описания процессов были использованы обобщенные функции Хилла [Likhoshvai, Ratushny, 2007], что позволило снизить размерность кинетической модели, не потеряв при этом степени детализации механизмов, лежащих в основе моделируемых процессов.

Десятки математических моделей описывают метаболические процессы, лежащие в основе синтеза АТФ митохондриями в эукариотических клетках. Математическое моделирование цепи переноса электронов в митохондриях началось с создания первой модели Чанса [Chance, 1967]. На первоначальных этапах были разработаны модели, описывающие регуляцию функционирования отдельных компонентов дыхательной цепи митохондрий, в которых было показано влияние pH и NO на активность цитохром *c* оксидазы [Pannala et al., 1985] и кислорода на активность АТФ-синтазы [Holzhütter et al., 1985]. Постепенное усложнение моделей, увеличение количества параметров и переменных, а также описание дополнительных метаболических процессов, привело к созданию обширных моделей, как например, к модели, созданной Базилом [Bazil et al., 2010], которая основана на более ранних теоретических исследованиях [Korzeniewski, Zoladz, 2001; Cortassa et al., 2006; Wu et al., 2007, Nguyen et al., 2007]. Данная модель адаптирована к многочисленным экспериментальным данным и позволяет теоретически подтвердить высказанное ранее предположение [Garlid, Paucsek, 2003] о влиянии K^+/H^+ транспортера на объем митохондриального матрикса. Разработка других моделей позволила изучить воздействие метаболитов на функционирование цепи переноса электронов в митохондриях, например, в условиях повышенного содержания кальция [Saa, Siqueira, 2013] и изменения уровня кислорода [Korzeniewski, Froncisz, 1991]. Создание тканеспецифичных моделей

митохондриальной цепи переноса электронов для сердечных мышц показало, что ионы кальция определяют потребление энергии в зависимости от потребности мышечных клеток [Cortassa et al., 2003] и являются важными регуляторами в поддержании метаболического гомеостаза [Saito et al., 2016].

Представленные здесь данные в целом демонстрируют фрагментарность теоретических исследований механизмов регуляции респираторных процессов, что может быть связано с недостатком экспериментальных данных для верификации моделей даже для такого хорошо изученного в молекулярно-генетическом отношении объекта, как *E. coli*. Более того, разработанные модели связаны, в основном, с анализом аэробного дыхания, и практически нет моделей, анализирующих особенности дыхания в анаэробных и микроаэробных условиях, характерных для естественных мест обитания *E. coli* и других энтеробактерий, важных для понимания микробиотических процессов в кишечнике млекопитающих и, в частности, человека.

Заключение по обзору литературы

В заключение необходимо отметить, что интерес к знаниям особенностей функционирования молекулярно-генетической системы утилизации нитрата и нитрита у *E. coli* в условиях анаэробного дыхания, характерного для естественных мест ее обитания, определяется свойствами самих субстратов. С одной стороны, нитрат является самым сильным акцептором электронов в анаэробной респираторной системе *E. coli* и наиболее выгодным с точки зрения продукции АТФ. С другой стороны, в процессе его утилизации синтезируются токсические для клетки вещества, и нитрит является одним из таких. В тоже время клетка *E. coli* не только создала молекулярно-генетическую систему строгой регуляции внутриклеточной концентрации нитрита, но и смогла использовать его в респираторной системе анаэробного дыхания, хотя и с меньшей эффективностью. Координация взаимодействия всех компонентов нитрат-нитритной системы с этой точки зрения представляет особый интерес. Именно *in silico* моделирование данного метаболического пути может позволить получить новые знания о механизмах утилизации токсических для клетки веществ, особенно в условиях функционирования только на нитрите.

Как следует из вышеприведенного обзора, в молекулярно-генетической системе дыхания на нитрите есть ряд невыясненных вопросов. Они касаются механизмов формирования цепи передачи электронов от формата к нитриту и организации транспортной системы нитрита в клетку и из клетки. Это послужило отправной точкой нашего исследования, а наличие экспериментальных данных о молекулярно-генетических механизмах регуляции экспрессии генов *nrfA*, *nirB*, *nirC* и *fdhF* и динамике накопления нитрита в среде в условиях стационарного роста клеток *E. coli* в проточном хемостате [Wang et al., 1999; Wang, Gunsalus, 2000; 2003] позволило разработать математическую модель утилизации нитрита в клетке *E. coli* и исследовать роль NirB и NrfA редуктаз и транспортного белка NirC в контроле внутриклеточного содержания нитрита, а также показать роль мембранного потенциала в регуляции активности и транспорта периплазматической NrfA редуктазы.

Глава II. Исследование механизмов регуляции скорости утилизации нитрита клетками *E. coli*

2.1. Методы расчета и анализа

Модель утилизации нитрита культурой клеток *E. coli* в хемостате разработана в терминах элементарных подсистем. К элементарным подсистемам модели относятся: процессы восстановления нитрита редуктазами, процессы регуляции экспрессии оперонов, кодирующих ферменты и транспортеры, процессы синтеза и деградации белков, их транспорта и др. Каждая из подсистем описывается математической моделью, совокупность которых формирует базу элементарных моделей, являющуюся основой при разработке общей модели.

Моделирование ферментативных реакций, протекающих в бактерии *E. coli*, проводилось в предположении квазистационарности протекания элементарных процессов. Скорости ферментативных реакций, скорости импорта и экспорта нитрита мембранным транспортером были описаны с использованием уравнения Михаэлиса-Ментен. Процесс формирования комплексов ферментов рассматривался как обратимая реакция, где субстратами выступают субъединицы комплекса.

Регуляторные процессы, такие как влияние нитрита на уровень транскрипции оперонов, кодирующих субъединицы ферментов, описывались с помощью обобщенной функции Хилла [Likhoshvai, Ratushny, 2007] от одной переменной, которая обозначала концентрацию нитрита, а характер влияния субстрата определялся значением показателя степени. Данный подход позволяет описать весь каскад химических и молекулярно-генетических процессов активации нитритом сенсорных мембранных киназ и последующую активацию транскрипционных факторов, определяющих уровень транскрипции оперона как единый обобщенный процесс.

При объединении подмоделей в единую модель системы обыкновенных дифференциальных уравнений, уравнение для каждой переменной составлялось по принципу закона суммирования локальных скоростей. В этом случае в правой части ОДУ, описывающего изменение концентрации определенного вещества, скорости процессов, в которых происходит наработка вещества (приток, синтез, транспорт извне), записывались с положительным знаком, а все скорости, в которых вещество

расходуется (деградация, утилизация, транспорт в другой компартмент) – с отрицательным.

Параметры модели были известны или оценены из опубликованных источников, а также на основании адаптации модели к экспериментальным данным Ванга и коллег, приведенным в работе [Wang et al., 1999], в которой исследовалась кинетика накопления нитрита в хемостате при достижении системы равновесия в зависимости от концентрации субстрата, подаваемого в хемостат. Для этого система дифференциальных уравнений была преобразована в систему алгебраических уравнений путем приравнивания правых частей к нулю, и находились положительные решения системы, используя стандартные функции в пакете Mathematica.

Нахождение стационарных решений моделей проводилось в пакете Mathematica. Для решения задачи Коши для системы обыкновенных дифференциальных уравнений (ОДУ) были использованы пакеты Mathematica и STEP. В пакете Mathematica применялся метод, встроенный по умолчанию, а также метод Гира. Задача Коши для системы ОДУ в пакете STEP [Фадеев, Гайнова, 1994] решалась методом Гира.

Принцип расчета задачи Коши для каждого значения параметра модели s , соответствующего концентрации подаваемого в хемостат нитрита, имитировал экспериментальную методику измерения стационарного уровня нитрита в хемостате при добавлении в хемостат определенного количества субстрата. Были рассчитаны значения переменных в отсутствие добавленного нитрита ($s=0$), которые являлись начальными условиями для системы ОДУ при решении задачи Коши в присутствии нитрита ($s>0$). Таким образом, другие стационарные решения, в случае их существования, лежат вне области исследования, поскольку не реализуются в эксперименте хемостата.

Количественной мерой адекватности модели служило среднеквадратичное отклонение (СКО) значений общей скорости утилизации нитрита, полученное по модели (V_M), от экспериментальных значений (V_{Exp}) при различных концентрациях добавленного нитрита (s), вычисленных на основании данных из работы [Wang et al., 1999]. СКО в данном случае вычислялось по формуле

$$СКО = \sum_s (V_M - V_{Exp})^2$$

2.2. Базовая модель утилизации нитрита клетками *E. coli* (M1)

В данном разделе представлена базовая кинетическая модель, в которой воспроизведены условия культивирования клеток *E. coli* в проточном хемостате на нитрите. Модель M1 описывает процессы утилизации нитрита периплазматической Nrf и цитоплазматической NirB редуктазами и процессы обмена нитритом между бактериальной клеткой и средой. Модель разработана на основе закона сохранения действующих масс и опирается на экспериментальные данные о структуре ферментов, кинетике протекания химических реакций и механизмах их регуляции.

2.2.1. Основные принципы базовой модели

Базовая модель утилизации нитрита в хемостате основана на следующих положениях.

1. Внеклеточный нитрит метаболизируется периплазматической формат-зависимой нитритредуктазой Nrf до аммония в соответствии со следующей стехиометрической схемой $\text{NO}_2^- + 6e^- + 7\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_3 + 2\text{H}_2\text{O}$. Кинетика этой реакции описывается уравнением Михаэлиса-Ментен согласно имеющимся кинетическим данным [Clarke et al., 2008; van Wonderen et al., 2008; Kemp et al., 2010].
2. В физиологических условиях фермент Nrf редуктаза функционирует в составе гетеротетрамерного комплекса NrfA₂NrfB₂ согласно структурным данным [Clarke et al., 2007; Lockwood et al., 2011]. В клетке *E. coli* белки NrfA и NrfB находятся примерно в равных количествах [Clarke et al., 2004]. Гены, кодирующие структуру мономерных субъединиц фермента, находятся в одном опероне [Wang et al., 1999].
3. Внутриклеточный нитрит утилизируется цитоплазматической НАДН-зависимой NirB нитритредуктазой до аммония в соответствии со следующей стехиометрической схемой $\text{NO}_2^- + 3\text{NADH} + 5\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+ + 3\text{NAD}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$. Кинетика этой реакции описывается уравнением Михаэлиса-Ментен согласно кинетическим данным [Coleman et al., 1978; Jackson et al., 1981]. Харборном и коллегами было установлено [Harborne et al., 1992], что в физиологических условиях NirB нитритредуктаза функционирует в составе гетеротримерного комплекса NirB₂NirD, субъединицы которого кодируются генами, входящими в состав одного оперона.
4. Предполагается, что скорости импорта и экспорта нитрита в клетку определяются концентрацией NirC транспортера. Данное предположение

основывается на том, что два других известных транспортера NarU и NarK рассматриваются рядом исследователей в качестве только нитрат-нитрит антипортеров, к тому же их активность импорта нитрита уступает активности NirC транспортера [Jia et al., 2009]. Кроме того, NirC транспортер кодируется тем же опероном, что и NirB редуктаза, что подразумевает сопряженность их действия в рамках одного метаболического пути.

5. Зависимость уровня экспрессии *nirC* гена, кодирующего структуру NirC транспортера, от концентрации нитрита аналогична таковой для гена *nirB*, поскольку гены *nirC* и *nirB* расположены в одном опероне (рис. 14). Кроме того, в модели учитывается, что концентрация белка NirC более чем в пять раз превышает концентрацию NirB согласно данным по скоростям трансляции мРНК NirC и NirB, полученным Харборном и коллегами [Harborne et al., 1992].

Структура модели разработана на основе вышеперечисленных данных и предположений с учетом экспериментальных данных Ванга и коллег [Wang et al., 1999; Wang, Gunsalus, 2000] по динамике накопления нитрита в хемостате и по динамике экспрессии *nrf* и *nir* оперонов в зависимости от концентрации нитрита. В этих работах клетки *E. coli* культивировались в анаэробных условиях в проточном хемостате, а субстратами служили нитрит и глюкоза. Постоянная скорость роста и плотность культуры в хемостате обеспечивались фиксированным уровнем потребления глюкозы. Метаболические процессы, проходящие в *E. coli*, и особенности культивирования бактерий в хемостате легли в основу структурной схемы модели, представленной на рис. 12.

Процессы, протекающие в хемостате и клетках *E. coli*, приведенные на рис. 12, описаны следующей автономной системой уравнений:

$$\begin{cases} u' = k_{flow}s + CV_{NirC,out}(u, w) - C(V_{Nrf}(u) + V_{NirC,in}(u)) - k_{flow}u, \\ w' = V_{NirC,in}(u) - V_{NirC,out}(u, w) - V_{NirB}(u, w) - k_{flow}w. \end{cases} \quad (2.1)$$

Здесь, u – концентрация нитрита во внеклеточном объеме хемостата, w – концентрация нитрита внутри клетки. Поскольку скорость поступления нитрита в хемостат является постоянной, а скорость его вывода из хемостата пропорциональна текущей концентрации, то скорость поступления нитрита в хемостат записана как $k_{flow}s$, где s имеет смысл подаваемой в хемостат концентрации нитрита, которая

равна стационарной концентрации нитрита в хемостате, устанавливающейся в отсутствие клеточной культуры. Далее параметр s будет называться «концентрация добавленного нитрита». Скорость оттока внеклеточного нитрита из хемостата обозначена как $k_{flow}u$. $k_{flow}w$ – скорость вымывания внутриклеточного нитрита за счет оттока клеток из хемостата, k_{flow} – константа скорости притока/оттока веществ в/из хемостата, C – относительная доля объема клеточной культуры в хемостате. $V_{Nrf}(u)$ – скорость утилизации индивидуальной клеткой внеклеточного нитрита нитритредуктазой Nrf, $V_{NirB}(w)$ – скорость утилизации индивидуальной клеткой внутриклеточного нитрита нитритредуктазой NirB, $V_{NirC,in}(u)$ – скорость импорта индивидуальной клеткой внеклеточного нитрита в клетку белком транспортером NirC, $V_{NirC,out}(u,w)$ – скорость транспорта (экспорта) индивидуальной клеткой внутриклеточного нитрита из клетки белком NirC.

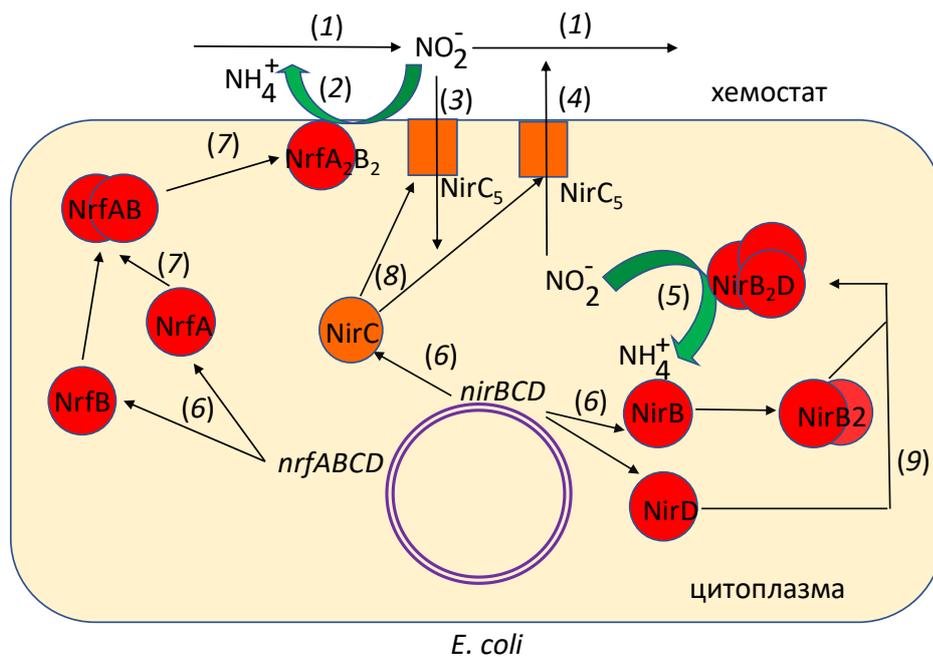


Рис. 12. Схема процессов, протекающих в хемостате при утилизации нитрита культурой клеток *E. coli* (модель M1). (1) – поступление нитрита в хемостат и его вывод из хемостата с постоянной скоростью (k_{flow}); (2) – переработка внеклеточного нитрита в аммоний периплазматической NrfA₂B₂ редуктазой ($V_{Nrf}(u)$); (3), (4) – транспорт внеклеточного нитрита в клетку ($V_{NirC,in}(u)$) и его экспорт из клетки в хемостат NirC транспортером ($V_{NirC,out}(u,w)$); (5) – утилизация внутриклеточного нитрита цитоплазматической NirB редуктазой ($V_{NirB}(w)$); (6) – синтез белков NrfA, NrfB с мРНК оперона *nrf* (m_{Nrf}) и белков NirB, NirC и NirD с мРНК оперона *nir* (m_{Nir}); (7) – формирование активной гетеротетрамерной формы Nrf редуктазы; (8) – формирование активной пентамерной формы NirC транспортера; (9) – формирование активной гетеротримерной формы NirB редуктазы.

Систему уравнений (2.1) назовем базовой моделью (M1). Вывод уравнений скорости утилизации нитрита Nrf и NirB ферментами, а также транспорта субстрата NirC транспортером, входящих в базовую модель, представлен ниже.

2.2.2. Вывод скорости утилизации нитрита периплазматической нитритредуктазой Nrf

При концентрациях нитрита в среде меньше 2 мМ основным ферментом переработки нитрита является периплазматическая Nrf нитритредуктаза. При этих концентрациях нитрита доля транскрипционной активности *nrf* оперона на порядок выше, чем *nir* оперона, кодирующего структуру второй NirB нитритредуктазы [Wang et al., 1999]. Основываясь на экспериментальных данных о значительном вкладе транскрипционного уровня регуляции в активность нитритредуктаз в клетке *E. coli* [Wang et al., 1999], в модели M1 принято, что количество мономеров белков NrfA и NrfB в клетке, составляющих субъединицы фермента Nrf, пропорционально относительной активности химерного белка NrfA- β -gal, которая показана точками на рис. 13.

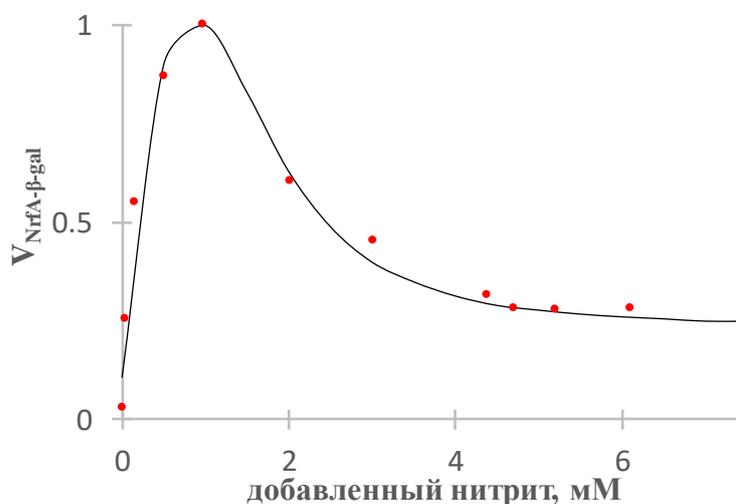


Рис. 13. Зависимость относительной концентрации белка NrfA- β -gal от концентрации нитрита в хемостате. Точками обозначены экспериментальные данные из работы [Wang, Gunsalus, 2000]. Сплошная линия — теоретические расчеты значений функции m_{Nrf} . Ось абсцисс — концентрация нитрита в хемостате (мМ), ось ординат — относительная активность химерного белка. Концентрация нитрита в хемостате, использованная в качестве шкалы измерения по оси абсцисс, вычислена на основании данных работы [Wang, Gunsalus, 2000].

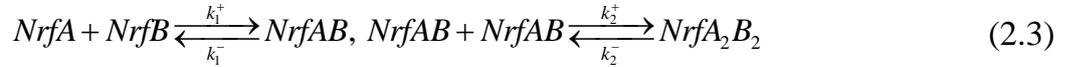
Механизм регуляции транскрипции *nrf* и *nir* оперонов нитритом обеспечивается достаточно сложным каскадным механизмом активации киназ и последующим их взаимодействием с транскрипционными факторами, поэтому в

модели M1 процессы регуляции транскрипции описаны обобщенной функцией Хилла, которая позволяет в наиболее простой феноменологической форме описывать эти процессы [Likhoshvai et al., 2007]. Таким образом, экспериментальные данные по активности химерного белка NrfA- β -gal были аппроксимированы обобщенной функцией Хилла $m_{Nrf}(u)$, зависящей от текущей концентрации нитрита в хеостате (u) (см. рис. 13), вид которой показан ниже.

$$m_{Nrf}(u) = \frac{\delta_{nrf,0} + \delta_{nrf,1} \left(\frac{u}{K_{nrf,1}} \right)^{h_{nrf,1}}}{1 + \left(\frac{u}{K_{nrf,1}} \right)^{h_{nrf,1}}} \frac{1 + \delta_{nrf,2} \left(\frac{u}{K_{nrf,2}} \right)^{h_{nrf,2}}}{1 + \left(\frac{u}{K_{nrf,2}} \right)^{h_{nrf,2}}} \quad (2.2)$$

Здесь, $\delta_{nrf,0}$ – уровень относительной транскрипции оперона $nrfABCD$; параметры $\delta_{nrf,1}$, $K_{nrf,1}$, $h_{nrf,1}$ описывают активацию оперона нитритом; $\delta_{nrf,2}$, $K_{nrf,2}$, $h_{nrf,2}$ описывают ингибирование экспрессии нитритом.

Концентрация активной формы Nrf фермента оценивалась, исходя из биохимической модели [Clarke et al., 2007; Lockwood et al., 2011]



Отсюда следует система дифференциальных уравнений:

$$\begin{cases} \frac{da}{dt} = \frac{db}{dt} = (k_1^- c - k_1^+ ab), \\ \frac{dc}{dt} = -(k_1^- c - k_1^+ ab) + 2(k_2^- d - k_2^+ c^2), \\ \frac{dd}{dt} = -(k_2^- d - k_2^+ c^2). \end{cases}$$

Здесь a , b – внутриклеточные концентрации свободных белков-мономеров NrfA и NrfB, c – внутриклеточная концентрация комплекса NrfAB, d – внутриклеточная концентрация активной гетеротетрамерной формы фермента Nrf, k_1^+ , k_2^+ и k_1^- , k_2^- – константы прямой и обратной реакций соответственно. Для определения стационарных значений a , c и d получаем систему алгебраических уравнений

$$ab = k_1 c, c^2 = k_2 d, a + c + 2d = a_0, b + c + 2d = b_0, \quad (2.4)$$

где $k_1 = \frac{k_1^-}{k_1^+}$ и $k_2 = \frac{k_2^-}{k_2^+}$ – константы диссоциации,

$$a_0 = C_{NrfA,max} m_{Nrf}(u), b_0 = C_{NrfB,max} m_{Nrf}(u), \quad (2.5)$$

a_0, b_0 – концентрации белков NrfA и NrfB с учетом их вхождения во все комплексы. Согласно принятому выше предположению данные концентрации пропорциональны относительной активности химерного белка NrfA- β -gal, аппроксимированной в модели M1 функцией (2.2), $C_{NrfA,max}, C_{NrfB,max}$ – коэффициенты пропорциональности.

В физиологической области положительных решений система (2.4) имеет единственное решение

$$c(u) = -\frac{k_2}{4} + \frac{1}{2} \sqrt{\frac{k_2^2}{4} + \frac{2b_1}{3} + \frac{R}{3\sqrt[3]{P}} + \frac{\sqrt[3]{P}}{3\sqrt[3]{2}}} - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{k_2^2}{2} + \frac{4b_1}{3} - \frac{R}{3\sqrt[3]{P}} - \frac{\sqrt[3]{P}}{3\sqrt[3]{2}}} + \frac{8c_1 - 4k_2b_1 - k_2^3}{4\sqrt{\frac{k_2^2}{4} + \frac{2b_1}{3} + \frac{R}{3\sqrt[3]{P}} + \frac{\sqrt[3]{P}}{3\sqrt[3]{2}}}}, \quad (2.6)$$

$$d(u) = c(u) / k_2, a(u) = a_0 - c(u) - 2d(u), b(u) = b_0 - c(u) - 2d(u),$$

где

$$b_1 = \frac{k_2}{2} \left[(a_0 + b_0) - \frac{k_2}{2} \right], c_1 = \frac{k_2^2}{4} \left[(a_0 + b_0) + k_1 \right], d_1 = \frac{k_2^2}{4} a_0 b_0,$$

$$R = \sqrt[3]{2} (b_1^2 + 12d_1 + 3k_2c_1),$$

$$Q = \sqrt{(27c_1^2 - 2b_1^3 + 72b_1d_1 - 9k_2b_1c_1 + 27k_2^2d_1)^2 - 4(b_1^2 + 12d_1 + 3k_2c_1)^3},$$

$$P = Q - 2b_1^3 + 27c_1^2 + 72b_1d_1 - 9k_2b_1c_1 + 27k_2^2d_1.$$

Зная концентрацию внутриклеточного активного фермента Nrf $d(c(u))$, можно вычислить скорости переработки внеклеточного нитрита индивидуальной клеткой ($V_{Nrf}(u)$) по формуле Михаэлиса-Ментен, которая описывает механизм реакции, катализируемой периплазматической Nrf нитритредуктазой [Clarke et al., 2008; van Wonderen et al., 2008; Kemp et al., 2010], в результате чего скорость утилизации нитрита периплазматической нитритредуктазой Nrf (V_{Nrf}) может быть записана в виде формулы:

$$V_{Nrf}(u) = kcat_{Nrf} \frac{u \cdot d(u)}{Km_{Nrf} + u}, \quad (2.7)$$

2.2.3 Вывод скорости утилизации нитрита цитоплазматической нитритредуктазой NirB

Скорость утилизации нитрита при его высоких концентрациях в среде определяется уровнем активности цитоплазматической редуктазы NirB и скоростью транспорта нитрита внутрь клетки. Поскольку единственно известным механизмом регуляции активности цитоплазматической нитритредуктазы нитритом является генетическая регуляция, то в модели M1 активности NirB редуктазы и транспортера NirC определяются уровнем транскрипции *nirBCD* оперона, т.е., согласно выше сформулированным предположениям, пропорциональны относительной активности химерного белка NirB-β-gal в зависимости от концентрации нитрита. Экспериментальные данные активности белка NirB-β-gal в зависимости от концентрации нитрита показаны на рис. 14 точками. Относительная активность оперона *nirBCD* аппроксимирована обобщенной функцией Хилла $m_{Nir}(u)$, вид которой приведен ниже.

$$m_{Nir}(u) = \frac{\delta_{nir,0} + \delta_{nir,1} \left(\frac{u}{K_{nir1}} \right)^{h_{nir1}} + \delta_{nir,2} \left(\frac{u}{K_{nir2}} \right)^{h_{nir2}}}{1 + \left(\frac{u}{K_{nir1}} \right)^{h_{nir1}} + \left(\frac{u}{K_{nir2}} \right)^{h_{nir2}}}, \quad (2.8)$$

где u – текущая концентрация нитрита в хемостате, а $\delta_{nir,0}$ – относительный уровень базовой транскрипции оперона *nir*, параметры $\delta_{nir,1}$, K_{nir1} , h_{nir1} , $\delta_{nir,2}$, K_{nir2} , h_{nir2} отражают активацию транскрипции нитритом.

Результаты адаптации функции $m_{Nir}(u)$ представлены на рис. 14.

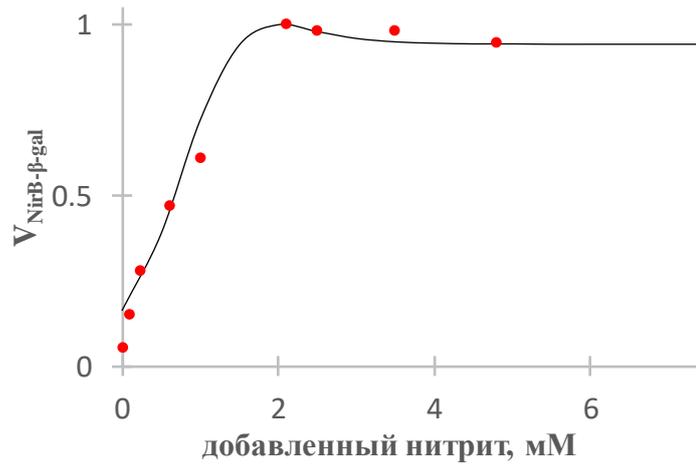
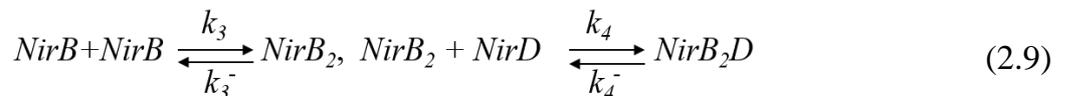


Рис. 14. Зависимость относительной концентрации белка NirB-β-gal от концентрации нитрита в хемостате. Точками обозначены экспериментальные данные из работы [Wang, Gunsalus, 2000]. Сплошная линия – теоретические расчеты значений функции m_{Nir} . Ось абсцисс – концентрация нитрита в хемостате (мМ), ось ординат – относительная активность химерного белка. Концентрация нитрита в хемостате, использованная в качестве шкалы измерения по оси абсцисс, вычислена на основании данных работы [Wang, Gunsalus, 2000].

Для подсчета концентрации цитоплазматической нитритредуктазы NirB использована биохимическая модель



Процессы, описанные на схеме (2.9), можно записать следующей системой дифференциальных уравнений

$$\begin{cases} \frac{de}{dt} = 2(k_3^- f - k_3^+ e), \\ \frac{df}{dt} = -(k_3^- f - k_3^+ e) + (k_4^- h - k_4^+ fg), \\ \frac{dh}{dt} = -(k_4^- h - k_4^+ fg), \end{cases}$$

стационарное решение которой определяется из системы алгебраических уравнений

$$e^2 = k_3 f, \quad fg = k_4 h, \quad e + 2f + 2h = e_0, \quad g + h = g_0 \quad (2.10)$$

где $k_3 = \frac{k_3^-}{k_3^+}$ и $k_4 = \frac{k_4^-}{k_4^+}$ – константы диссоциации,

$$e_0 = C_{\text{NirB}, \max} m_{\text{Nir}}(u), \quad g_0 = C_{\text{NirD}, \max} m_{\text{Nir}}(u) \quad (2.11)$$

e_0, g_0 – внутриклеточные концентрации белков NirB и NirD с учетом их вхождения во все комплексы, $C_{NirB, \max}, C_{NirD, \max}$ – коэффициенты пропорциональности концентрации белков NirB и NirD относительной активности химерного белка NirB- β -gal, аппроксимированной в модели M1 функцией (2.8), e, g – внутриклеточные концентрации свободных форм белков-мономеров NirB и NirD, f – внутриклеточная концентрация димера NirB₂, h – внутриклеточная концентрация цитоплазматической нитритредуктазы, активной формой которой является тример NirB₂D. Концентрация цитоплазматической нитритредуктазы вычисляется из (2.10) по формуле

$$h(u) = \frac{1}{4}A + \frac{1}{2}\sqrt{\frac{1}{4}A^2 - \frac{1}{4}K + \frac{1}{12}K + S + U} + \frac{1}{2}\sqrt{\frac{1}{2}A^2 - \frac{1}{3}K - S - U + \frac{-(-A)^3 - 2M - AK}{4\sqrt{\frac{1}{4}A^2 - \frac{1}{6}K + S + U}}}, \quad (2.12)$$

где

$$A = e_0 + 2g_0 + 2k_4, \quad K = e_0^2 + 8e_0g_0 + 4g_0^2 + 4e_0k_4 + 8g_0k_4 + 4k_4^2, \\ M = -2e_0^2g_0 - 4e_0g_0^2 - 4e_0g_0k_4 - k_3k_4, \quad T = 48e_0^2g_0^2 + 12AM + K^2, \\ W = \sqrt{-4T^3 + (432e_0^2g_0^2A^2 + 108M^2 - 288e_0^2g_0^2K + 36AMK + 2K^3)^2}, \\ U = \frac{1}{12\sqrt[3]{2}}\sqrt[3]{432e_0^2g_0^2A^2 + 108M^2 - 288e_0^2g_0^2K + 36AMK + 2K^3 + W}, \\ S = \frac{T}{6\sqrt[3]{4(432e_0^2g_0^2A^2 + 108M^2 - 288e_0^2g_0^2K + 36AMK + 2K^3 + W)}}.$$

Механизм реакции утилизации нитрита, осуществляемой цитоплазматической NirB нитритредуктазой, описывается уравнением Михаэлиса-Ментен [Coleman et al., 1978; Jackson et al., 1981]:

$$V_{NirB}(u, w) = kcat_{NirB_2D} \frac{w \cdot h(u)}{Km_{NirB_2D} + w} \quad (2.13)$$

2.2.4 Вывод скоростей импорта и экспорта нитрита транспортером NirC

Скорость транспорта нитрита как внутрь клетки из окружающей среды, так и наоборот, определяется активностью NirC белкового комплекса согласно

положениям базовой модели M1, пункт 4 (параграф 2.2.1). В модели принято, что активная форма NirC представлена в пентамерной форме, что основывается на данных о структуре гомологичного белка NirC бактерии *Salmonella typhimurium* [Lu et al., 2012] – ближайшего родственника *E. coli*. В соответствии с этим его концентрация вычисляется по формуле

$$C_{NirC}(u) = C_{NirC,max} \frac{m_{Nir}(u)^5}{Kd_{NirC}^4 + 5 \cdot m_{Nir}(u)^4} \quad (2.14)$$

Механизмы импорта и экспорта нитрита NirC транспортером не были изучены экспериментально, поэтому скорость импорта нитрита из хемостата в клетку были описаны простейшей формулой химической реакции по уравнению Михаэлиса-Ментен:

$$V_{NirC,in}(u) = kin_{NirC} \cdot \frac{u \cdot C_{NirC}(u)}{Km_{NirC,in} + u} \quad (2.15)$$

а скорость экспорта нитрита из клетки в хемостат – формулой

$$V_{NirC,out}(u, w) = kout_{NirC} \cdot \frac{w \cdot C_{NirC}(u)}{Km_{NirC,out} + w} \quad (2.16)$$

2.2.5. Оценка параметров модели M1

Значения параметров функций $m_{Nrf}(u)$ и $m_{Nir}(u)$ были оценены методом наименьших квадратов. Оптимальные значения параметров представлены в таблицах 3 и 4. Оценка параметров $k_1 = Kd_{NrfAB}$, $k_2 = Kd_{NrfA_2B_2}$, $kcat_{Nrf}$, Km_{Nrf} в уравнениях (2.6), (2.7) проведена на основании данных из работ Кларка, Кемпа и коллег [Clarke et al., 2008; Kemp et al., 2010; Clarke et al., 2007].

Значения параметров $C_{NirB,max}$, $C_{NirD,max}$, $k_3 = Kd_{NirB_2}$, $k_4 = Kd_{NirB_2D}$, $kcat_{NirB_2D}$, Km_{NirB_2D} в уравнениях (2.11)–(2.13) оценены на основании данных из работ Колемана и коллег [Coleman et al., 1978^a; Coleman et al., 1978^b]. Значения параметров $C_{NirC,max}$, kin_{NirC} , $Km_{NirC,in}$, $kout_{NirC}$, $Km_{NirC,out}$ в уравнениях (2.14)–(2.16) оценены на основании адаптации модели M1 к данным [Wang, Gunsalus, 2000].

Оценка доли объема, занимаемого культурой *E. coli* в хемостате, проведена на основании данных работы [Wang et al., 1999], согласно которым при фиксированной

концентрации глюкозы (2.25 мМ) в среде и постоянной скорости ее поступления в хемостат, скорость роста клеток задана и постоянна. Длительность клеточного цикла при этом составляет 70 мин. Исходя из этого, параметр C в модели М1 (2.1) принят постоянным. Учитывая значения вышеперечисленных параметров развития культуры в хемостате [Wang et al., 1999] и скорости потребления глюкозы культурой клеток в аналогичных лимитирующих условиях [Wright, Lockhart, 1965], был оценен интервал, в котором может изменяться значение параметра C : $0.0001 \leq C \leq 0.002$. При анализе модели использовано значение $C=0.0003$.

Значения параметров базовой модели М1, использованные в уравнениях (2.1)–(2.7) приведены в табл. 3.

Таблица 3. Список параметров модели М1 для уравнений (2.1)–(2.7).

Параметр	Название параметра	Значение параметра	Формула	Источник оценки значения
k_{flow}	Константа скорости протока в хемостате	$1.65 \cdot 10^{-4}$ мМ/сек	(2.1)	[Wang et al., 1999]
$\delta_{nrf,0}$	Параметры обобщенной функции Хилла (2.2), аппроксимирующей данные экспериментов, представленных на рис. 13, и отражающих активность экспрессии <i>nrf</i> оперона в зависимости от установившейся концентрации нитрита в хемостате	4.5	(2.2)	[Wang et al., 1999]
$\delta_{nrf,1}$		60		
$K_{nrf,1}$		0.3571 мМ		
$h_{nrf,1}$		1.3		
$\delta_{nrf,2}$		0.16		
$K_{nrf,2}$		1.7 мМ		
$h_{nrf,2}$		3.0		
$C_{NrfA,max}$	Максимальная концентрация белка NrfA в клетке	0.0065 мМ	(2.5)	[Lockwood et al., 2011; Clarke et al., 2004; Poock et al., 2002]
$C_{NrfB,max}$	Максимальная концентрация белка NrfB в клетке	0.0065 мМ		[Clarke et al., 2004]
$k_1 \equiv Kd_{NrfAB}$	Константа диссоциации реакции формирования димера NrfAB	0.00004 мМ	(2.5), (2.6)	[Clarke et al., 2007]
$k_2 \equiv Kd_{NrfA_2B_2}$	Константа диссоциации реакции формирования тетрамера NrfA ₂ B ₂	0.004 мМ		[Clarke et al., 2007]
$kcat_{Nrf}$	Каталитическая константа нитритредуктазы Nrf	770 сек ⁻¹	(2.7)	[Kemp et al., 2010]
Km_{Nrf}	Константа Михаэлиса нитритредуктазы Nrf для нитрита	0.03 мМ		[Clarke et al., 2008]
C	Относительная доля объема клеточной культуры в хемостате	0.0003	(2.1)	[Wang et al., 1999; Wright, Lockhart, 1965]

Размерность параметров обозначена следующим образом: мМ – миллимоль на литр, сек – секунды, если размерность не указана, то величина является безразмерной.

Параметры базовой модели из уравнений (2.8)–(2.17) для двух вариантов модели M1 приведены в таблице 4.

Таблица 4 Список параметров модели M1 для уравнений (2.8)–(2.17).

Параметр	Название параметра	Значение для первого набора параметров	Значение для второго набора параметров	Формула	Источник оценки значения
$\delta_{nir,0}$	Параметры обобщенной функции Хилла (2.8), аппроксимирующей данные экспериментов, представленных на рис. 14 и отражающих активность экспрессии <i>nir</i> оперона в зависимости от установившейся концентрации нитрита в хемостате	2.3	2.3	(2.8)	[Wang et al., 1999]
$\delta_{nir,1}$		13	13		
K_{nir1}		1.0 мМ	1.0 мМ		
h_{nir1}		2.0	2.0		
$\delta_{nir,2}$		13,2	13,2		
K_{nir2}		1.7 мМ	1.7 мМ		
h_{nir2}		8.3	8.3		
$C_{NirB,max}$	Максимальная концентрация белка NirB в клетке	0.0052 мМ	0.0034 мМ	(2.11)	[Coleman et al., 1978 ^a]
$C_{NirD,max}$	Максимальная концентрация белка NirD в клетке	0.0052 мМ	0.0034 мМ		
$k_3 \equiv Kd_{NirB_2}$	Равновесная константа диссоциации реакции формирования димера NirB ₂	0.002 мМ	0.002 мМ	(2.12)	
$k_4 \equiv Kd_{NirB_2D}$	Равновесная константа диссоциации реакции формирования тримера NirB ₂ D	0.002 мМ	0.002 мМ		
$kcat_{NirB_2D}$	Каталитическая константа фермента NirB	1100.0 сек ⁻¹	1100.0 сек ⁻¹	(2.13)	
Km_{NirB_2D}	Константа Михаэлиса фермента NirB	0.006 мМ	0.006 мМ	(2.13)	[Coleman et al., 1978 ^a]
$C_{NirC,max}$	Максимальная концентрация белка NirC в клетке	0.026 мМ	0.017 мМ	(2.14)	
Kd_{NirC}	Константа диссоциации реакции формирования пентамера NirC	0.0475 мМ	0.0475 мМ		
kin_{NirC}	Каталитическая константа скорости импорта нитрита в клетку белком NirC	150 сек ⁻¹	500 сек ⁻¹	(2.15)	[*]
$Km_{NirC,in}$	Константа Михаэлиса процесса импорта нитрита в клетку белком NirC	1 мМ	1 мМ		
$kout_{NirC}$	Каталитическая константа скорости экспорта нитрита из клетки белком NirC	1000 сек ⁻¹	1200 сек ⁻¹	(2.16)	
$Km_{NirC,out}$	Константа Михаэлиса процесса экспорта нитрита из клетки белком NirC	1 мМ	0.1 мМ		

Размерность параметров: мМ – миллимоль на литр, сек – секунды, если размерность не указана, то величина является безразмерной.

* – значение параметра подобрано в результате численных экспериментов.

2.2.6. Оценка скорости утилизации нитрита нитритредуктазами NrfA и NirB

Эксперименты Ванга и коллег [Wang, Gunsalus, 2000] по определению зависимости уровня равновесного значения нитрита от концентрации добавленного нитрита позволяют рассчитать общую скорость утилизации нитрита в хемостате культурой клеток *E. coli* (точки на рис. 15). Для наглядности экспериментальные данные были аппроксимированы теоретической кривой

$$V_{all} = 0.778 \cdot \frac{0.01 + \left(\frac{s}{0.9}\right)}{1 + \left(\frac{s}{0.9}\right)}, \quad (2.17)$$

где s – концентрация добавленного нитрита. Параметры для функции V_{all} были оценены методом нелинейной регрессии, используя пакет Mathematica. При этом значение среднеквадратичного отклонения от экспериментальных данных (CKO), формула которого приведена в разделе методы расчета и анализа, равно 0.024.

Результаты аппроксимации данных по общей скорости утилизации нитрита на графике (рис. 15) показаны синей кривой.

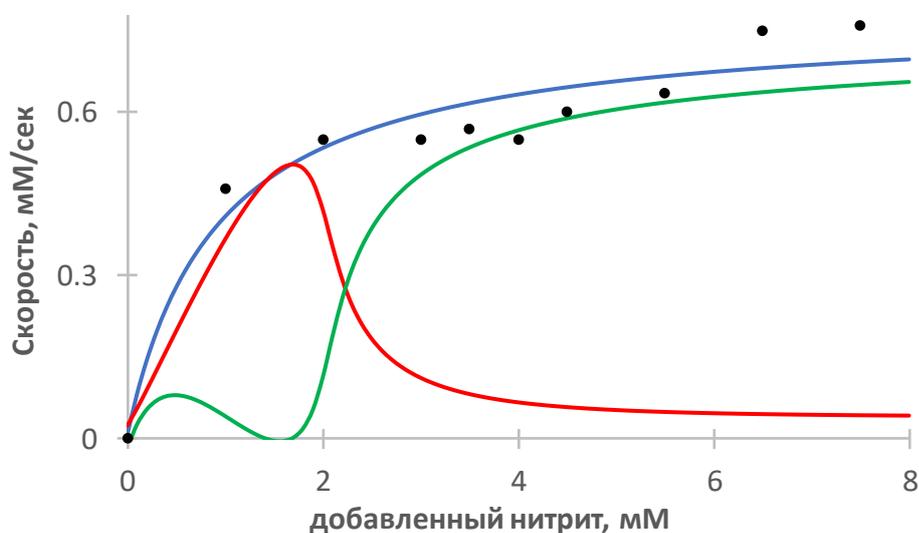


Рис. 15. Скорость потребления нитрита индивидуальной клеткой. Синяя кривая – аппроксимация экспериментальных точек функцией V_{all} ; красная кривая – абсолютная скорость утилизации нитрита Nrf нитритредуктазой, рассчитанная по модели M1 (2.2)–(2.7) при $C_{NrfA,max} = C_{NrfB,max} = 8.1$ мкМ и значениях остальных параметров из табл. 3; зеленая кривая – скорость внутриклеточного потребления нитрита индивидуальной клеткой, рассчитанная как разность значений аппроксимирующей кривой и скорости утилизации нитрита Nrf. Точки – скорость утилизации нитрита, рассчитанная из данных в работе [Wang, Gunsalus, 2000]. Ось абсцисс – концентрация добавленного нитрита (мМ), ось ординат – скорость потребления нитрита (мМ/сек).

Экспериментальные данные по скорости утилизации и накоплению нитрита в хемостате не дают представления о соотношении активностей ферментов, утилизирующих и транспортирующих нитрит. Однако на основании результатов расчетов математической модели M1 (2.1) была получена теоретическая оценка соотношения транспорта и скоростей утилизации нитрита двумя нитритредуктазами.

Активность периплазматической редуктазы рассчитана на основании представления о том, что скорость определяется уровнем активности фермента, который, в свою очередь, пропорционален активности экспрессии оперона *nrfABCD*, кодирующего субъединицы комплекса. Максимальный уровень транскрипции оперона *nrf*, согласно данным [Wang, Gunsalus, 2000], достигается при добавлении в хемостат 2 мМ нитрита, что означает максимально возможный вклад периплазматической редуктазы в скорость утилизации нитрита. Из результатов расчета модели M1 (при добавлении 2 мМ нитрита, рис. 15) видно, что скорость утилизации нитрита Nrf редуктазой не может быть выше 0.55 мМ/сек.

Для расчета зависимости скорости утилизации нитрита индивидуальной клеткой за счет работы Nrf нитритредуктазы от разных концентраций добавленного нитрита используются уравнения (2.2)–(2.7). Значения всех параметров, входящих в данные формулы, кроме параметров $C_{NrfA,max}$ и $C_{NrfB,max}$, известны из литературных источников или были оценены на основе экспериментальных данных (табл. 3). Оценка значений параметров $C_{NrfA,max}$ и $C_{NrfB,max}$ была проведена для $m_{Nrf} = 1$, что соответствует концентрации добавленного нитрита равной 2 мМ и максимально возможной при этом скорости V_{Nrf} равной 0.55 мМ/сек. Также было предположено, что белки NrfA и NrfB нарабатываются в эквимольных количествах, т.е. $C_{NrfA,max} = C_{NrfB,max}$, поскольку оба белка кодируются генами, расположенными в одном опероне. Исходя из этого, было оценено, что $C_{NrfA,max} = C_{NrfB,max} = 8.1$ мкМ. Данная оценка по порядку соответствует независимым измерениям, проведенным в работе [Roock et al., 2002].

Зная значения всех параметров функции V_{Nrf} , можно рассчитать значения скорости утилизации нитрита периплазматической редуктазой при других значениях концентраций добавленного нитрита (рис. 15, красная кривая). Из рис. 15 хорошо видно, что скорость утилизации нитрита Nrf нитритредуктазой,

рассчитанная при 1 мМ добавленного нитрита, составляет 0.28 мМ/сек, что существенно ниже оценки 0.46 мМ/сек, полученной из данных экспериментов (точка (1,0.46) на рис. 15).

Из этих данных можно также определить скорость внутриклеточного потребления нитрита клеткой. Ее можно представить как разность значений общей скорости утилизации нитрита в хемостате культурой клеток *E. coli*, вычисленной на основании экспериментальных данных (рис. 15, синяя кривая), и значениями скорости утилизации нитрита Nrf редуктазой (рис. 15, красная кривая), полученной на основании расчетов модели M1. Эта кривая внутриклеточного потребления нитрита (рис. 15, зеленая кривая) имеет два максимума – в области малых (< 1 мМ) и больших (> 3 мМ) значений концентраций добавленного нитрита.

Высокую внутриклеточную скорость утилизации нитрита при концентрациях добавленного субстрата выше 3 мМ (рис. 15, зеленая кривая) достаточно легко объяснить сопряженной активностью системы транспорта нитрита, обеспечиваемой NirC транспортером, и цитоплазматической нитритредуктазой NirB. Эта активность при концентрациях нитрита больше 3 мМ определяется высокой активностью оперона *nirBDC* [Wang, Gunsalus, 2000], кодирующего эти белки [Harborne et al., 1992].

2.2.7. Анализ транспортных потоков нитрита и его утилизации внутри клетки

Для оценки скорости утилизации внутриклеточного нитрита цитоплазматической редуктазой на первом этапе была проведена адаптация подмодели транспорта и цитоплазматической утилизации нитрита (уравнения (2.13)–(2.16)) к экспериментальным данным по динамике активности *nirBCD* в зависимости от добавленного нитрита [Wang, Gunsalus, 2000].

Поскольку необходимых экспериментальных данных о каталитических константах NirC и NirB белковых комплексов нет, то в расчетах, при оценке скоростей импорта, экспорта и цитоплазматической утилизации нитрита учитывалось, что в условиях анаэробного роста культуры клеток *E. coli* на 20 мМ нитрата, когда концентрация нитрита в ростовой среде достигает 5 мМ, внутриклеточная концентрация нитрита не превышает 0.1 мМ [Clegg et al., 2002], т.е. в клетке он находится в следовых количествах.

В отсутствие данных о соотношении скоростей импорта и экспорта нитрита в ходе адаптации модели M1 были рассмотрены два альтернативных случая соотношения скоростей импорта/экспорта нитрита и его цитоплазматической утилизации. Каждому из случаев соответствуют различные наборы параметров. Первый набор параметров определяет приблизительно равное соотношение стационарной скорости импорта нитрита из хемостата в клетку (рис. 16а, оранжевая кривая) и скорости его внутриклеточной утилизации (рис. 16а, зеленая кривая). Такое соотношение определяет детоксификацию внутриклеточного нитрита практически полностью за счет работы цитоплазматической нитритредуктазы, что объясняет отсутствие накопления избыточного нитрита внутри клетки (рис. 16б), и, как следствие, крайне низкую скорость экспорта нитрита из клетки (рис. 16а, фиолетовая кривая). Второй набор параметров описывает случай, для которого скорость импорта нитрита примерно в два с половиной раза превосходит скорость его внутриклеточной утилизации. В данном варианте избыток токсического нитрита не утилизируется нитритредуктазой, как это было в модели M1 с первым вариантом параметров, а выводится из клетки с высокой скоростью (рис. 16в, фиолетовая кривая). Результаты расчетов модели M1 с обоими наборами параметров позволяют воспроизводить экспериментальные данные [Wang, Gunsalus 2000] по скорости утилизации нитрита в хемостате (рис. 16а, в – синие линии).

Что касается внутриклеточного нитрита, то для обоих вариантов набора параметров модели M1 (2.1) (рис. 16б, в) его концентрация не превышает границы 0.1 мМ на всем интервале изменения добавленного нитрита. Эти результаты вполне соответствуют экспериментальным данным [Clegg et al., 2002] и представлению, что при более высоких концентрациях нитрит токсичен для клетки, и она выработала механизмы поддержания его концентрации на низком физиологическом уровне, экспортируя его излишки из клетки в среду.

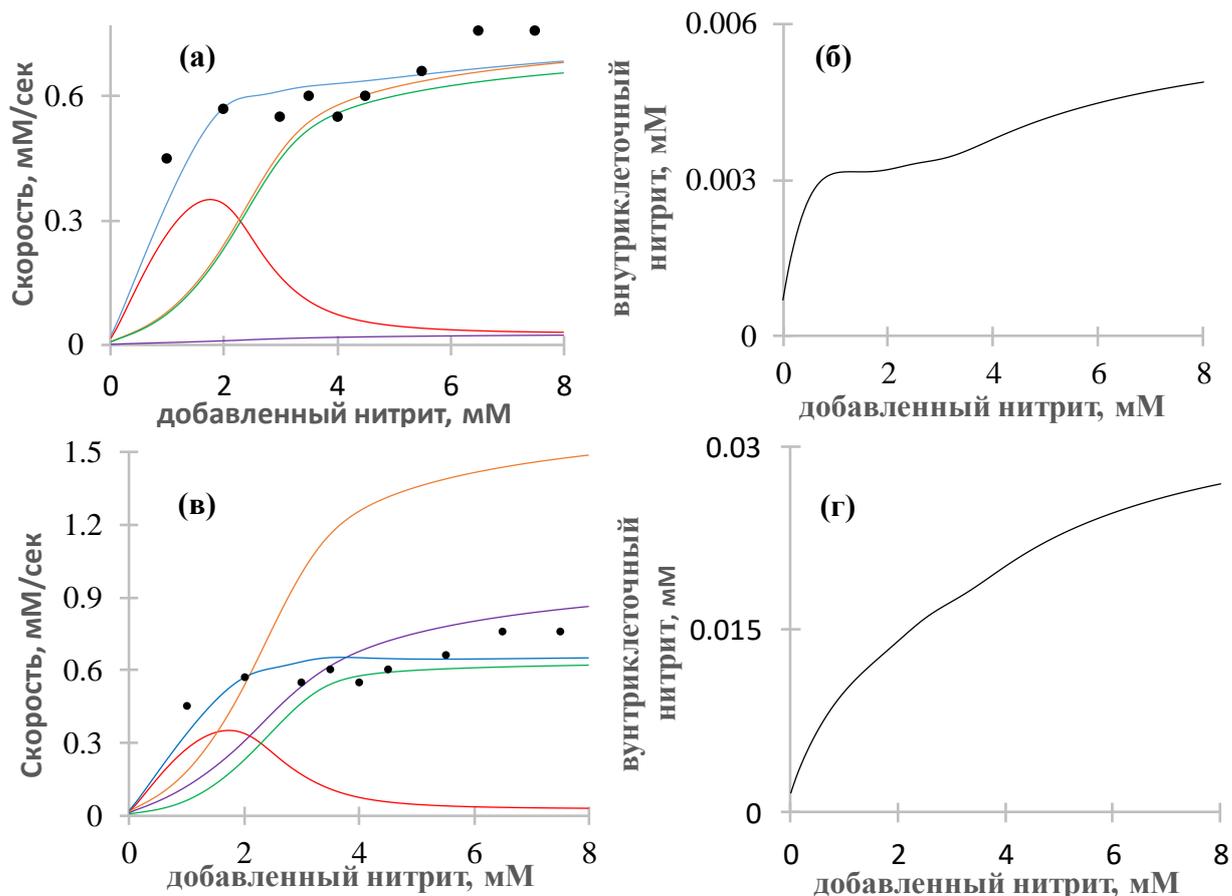


Рис. 16. Скорости утилизации нитрита (*а, в*) и динамика накопления внутриклеточного нитрита (*б, г*) в зависимости от концентрации подаваемого субстрата в хемостат, рассчитанные по модели M1 с первым (*а, б*) и вторым (*в, г*) набором параметров. Точки – экспериментальные данные, рассчитанные из работы [Wang, Gunsalus 2000]. Кривые – результат расчета модели M1: на (*а, в*) красным цветом обозначена скорость утилизации нитрита Nrf редуктазой, зеленым цветом – NirB редуктазой, оранжевым и фиолетовым цветами – скорость импорта и экспорта (в обратных координатах) нитрита соответственно, синим цветом – общая скорость утилизации нитрита.

Следует отметить, что предсказанная моделью M1 динамика изменения концентрации внутриклеточного нитрита, не позволяет ему выступать в качестве регулятора эффективности экспрессии оперонов, кодирующих структуру ферментов, утилизирующих нитрит. Этот факт согласуется с известными механизмами индукции генов нитритного метаболизма внеклеточным нитритом через сенсорные киназы NarX и NarQ, локализованные в мембране клетки, и через транскрипционные факторы NarL и NarP [Cavicchioli et al., 1996].

Рассчитанное *СКО* для модели M1 равно 0.044, что почти в два раза выше значения, полученного для аппрокимирующей функции, равного 0.024. Исследование динамики функционирования модели M1 (2.1), описывающей кинетику утилизации как периплазматической, так и цитоплазматической

нитритредуктазы, и процессы транспорта нитрита, показало, что модель адекватно описывает процессы функционирования системы утилизации нитрита, проходящие при добавлении более 2 мМ нитрита, в то время как в области низких концентраций нитрита (меньше 1 мМ) приходится предполагать изначально более высокую активность переработки нитрита клеткой, чем это следует из генетических экспериментов [Wang, Gunsalus 2000].

Оценка этой дополнительной активности (V_{add}), необходимой для корректного описания экспериментальных данных, представленных на рис. 17б, показана на рис. 17а синей кривой.

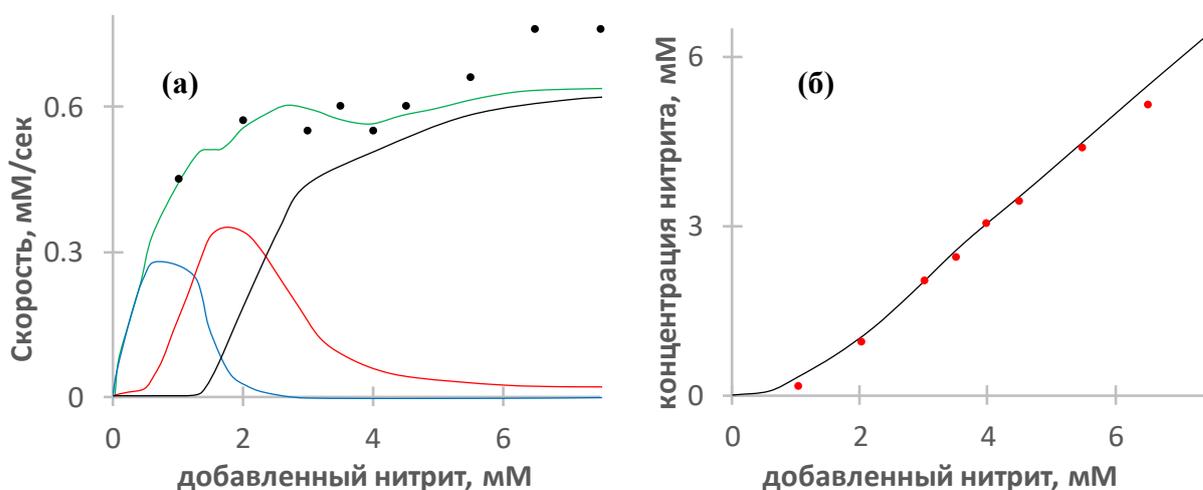


Рис. 17. (а) – зависимость скорости (V) утилизации нитрита от концентрации добавленного в хемостат нитрита. Синяя кривая отражает V_{add} , красная – V_{nrf} , черная – V_{nirB} , зеленая – совместное действие V_{nrf} , V_{nirB} и V_{add} . Точки – пересчитанные экспериментальные данные о скорости утилизации нитрита в хемостате из работы [Wang et al., 1999]. (б) – зависимость стационарного уровня нитрита в хемостате от концентрации добавляемого нитрита. Точки – экспериментальные данные [Wang et al., 1999]. Кривая – расчет модели M1 с учетом V_{add} .

В следующем параграфе рассматриваются возможные источники дополнительной нитрит-утилизирующей активности в области низких концентраций нитрита.

2.2.8. Анализ источников дополнительной нитрит-утилизирующей активности в области низких концентраций субстрата в среде

Активность ферментов, как правило, зависит от внешних условий, таких как pH, состав и температура среды. Однако, поскольку эксперимент Ванга и коллег [Wang, Gunsalus 2000] по измерению скорости утилизации нитрита проводился в условиях хемостата, в котором поддерживается постоянство внешней среды и плотности культуры клеток, то внешние факторы не могут быть причиной

дополнительной нитрит-утилизирующей активности в области низких концентраций субстрата. Следовательно, выявленный согласно результатам модели M1 источник дополнительной нитрит-перерабатывающей активности в области низких концентраций добавленного нитрита, необходимо искать среди внутренних факторов метаболической системы.

В области концентраций добавленного нитрита менее 3 мМ нитрит-утилизирующая активность имеет двойное происхождение. Одна составляющая субстрат-перерабатывающей активности объясняется активностью Nrf редуктазы (рис. 15, красная кривая), природа второй активности (рис. 15, зеленая кривая), представляющая собой разность между экспериментально полученной скоростью утилизации нитрита и скоростью переработки нитрита Nrf редуктазой, не известна.

Были проанализированы следующие источники дополнительной нитрит-утилизирующей активности: 1) за счет наличия дополнительного фермента, активного только в этой области концентраций, 2) за счет повышенной наработки субъединиц Nrf комплекса, 3) за счет более высокой активности Nrf фермента в области низких концентраций нитрита.

Гипотеза о дополнительном ферменте, который активен только в области 0–1 мМ нитрита, была отвергнута на основании анализа молекулярно-генетических механизмов регуляции экспрессии генов, контролирующих структуру ферментов NarF, NarG, NarZ, NarK, NarU, NirB и NirC, которые могут утилизировать и транспортировать нитрит. Все эти ферменты в данной области имеют незначительную активность, которая возрастает только при концентрации нитрита более 2 мМ [Wang, Gunsalus 2000; Wang et al., 1999; Kolesnikow et al., 1992; Bonnefoy, Demoss, 1994; Clegg et al., 2002; Rowley et al., 2012].

Два других предположения о повышенной наработке или повышенной активности Nrf редуктазы связаны со свойствами фермента как периплазматического белка, участвующего в формировании протонного градиента. Исходя из различных косвенных данных, можно предположить, что каталитические свойства фермента и секреция в периплазму зависят от наличия электрического потенциала на мембране клетки, а локализация в периплазме отражается на стабильности белка [Daniels et al., 1981; Talmadge, Gilbert, 1982; van Wonderen et al., 2008; Price, Driessen, 2010]. То есть не исключено, что простая оценка в модели M1

активности Nrf фермента по концентрации белка в цитоплазме клетки, которая была основана на активности химерного белка NrfA- β -gal [Wang, Gunsalus 2000], может не соответствовать действительности и быть причиной наблюдаемых противоречий.

Высказанные предположения были проанализированы в экспериментах *in silico*, результаты которых приведены ниже.

2.2.9. Анализ возможных механизмов, влияющих на активность периплазматической нитритредуктазы

Высокая активность Nrf фермента в области низких концентраций нитрита может быть достигнута за счет более высокой концентрации периплазматической Nrf редуктазы при низких уровнях добавленного нитрита (меньше 1 мМ), чем это следует из генетических исследований [Wang, Gunsalus, 2000]. Результаты расчетов подмодели (2.2)–(2.7), реализующих данное предположение, представлены на рис. 18(а–г). Расчеты проводились для различных значений базовых уровней периплазматического фермента в клетке (в отсутствие нитрита): 16%, 45%, 67% и 86% от максимального уровня периплазматического фермента, который наблюдается при индукции нитритом. Повышение базового уровня синтеза субъединиц периплазматической редуктазы приводит к увеличению активности Nrf редуктазы и снижению необходимой дополнительной активности, вплоть до ее исчезновения, при значениях базового синтеза близкого к максимальному, наблюдаемому при индукции 2 мМ добавленного нитрита (рис. 18г, кривая 3). Также стоит отметить, что в последнем случае зависимость внутриклеточной утилизации нитрита (рис. 18г, кривая 3) от концентрации добавленного субстрата совпадает с характером влияния нитрита на транскрипционную активность *nir* оперона (рис. 14).

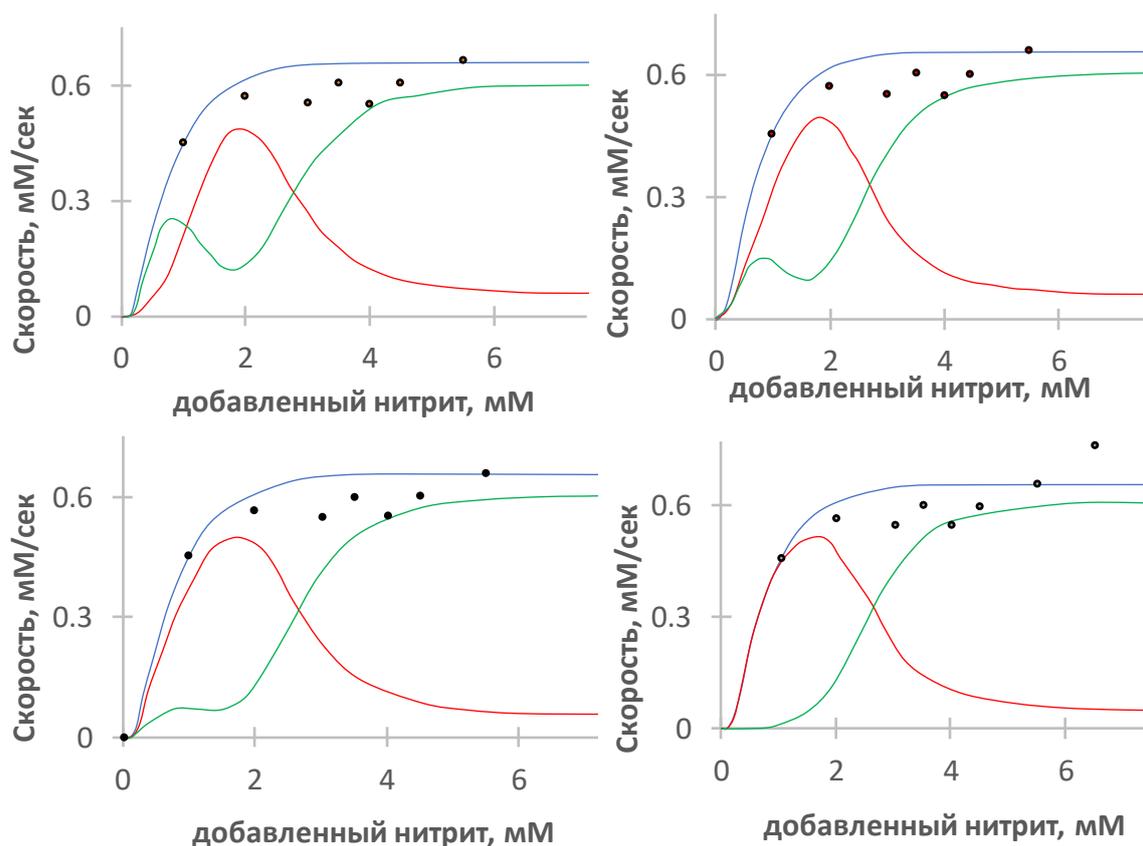


Рис. 18. Потребление нитрита индивидуальной клеткой при разных активностях фермента NrfA. График (а) рассчитан при $\delta_{nrf,0} = 15.0$, график (б) – $\delta_{nrf,0} = 30.0$, график (е) – $\delta_{nrf,0} = 40.0$, график (з) – $\delta_{nrf,0} = 50.0$. Для всех расчетов $C_{NrfA,max} = C_{NrfB,max} = 7.6$ мкМ, значения остальных параметров приведены в табл. 3.

Таким образом, введение в модель предположения о наличии высоких концентраций NrfA и NrfB белков в клетке в отсутствие нитрита позволяет получить вид кривой внутриклеточной утилизации нитрита, соответствующей экспериментальным данным. Однако предположение о высоком базовом уровне активности оперона *nrf* вступает в конфликт с экспериментальными данными, согласно которым эффективность экспрессии *nrf* оперона в отсутствие нитрита составляет примерно 3% от максимального уровня его индукции [Wang, Gunsalus, 2000].

Возможность поддержания высокой концентрации периплазматических белков в периплазме одновременно с низким экспериментально наблюдаемым базовым уровнем транскрипционной активности кодирующего оперона возможен при локальной высокой стабильности белков в периплазматическом пространстве. Для периплазматических белков, каковым является Nrf редуктаза, показано

[Talmadge, Gilbert, 1982], что гетерологичные белки, синтезированные в клетке *E. coli* и транспортированные в периплазму, более чем в 10 раз стабильнее тех, которые локализованы в цитоплазме. На данный момент нет экспериментальных данных о стабильности Nrf комплекса или его субъединиц, и также данных об их количестве в клетке при низких концентрациях нитрита или в его отсутствии. Поэтому принятие гипотезы об изменении стабильности субъединиц, или целого комплекса периплазматической нитритредуктазы, требует принятия предположения о существовании дополнительного механизма влияния нитрита на стабильность периплазматических белков в отсутствие экспериментальных данных.

Nrf редуктаза является респираторным ферментом, и ее активность приводит к формированию мембранного потенциала, который может оказывать влияние на сродство фермента к субстрату [Roosk et al., 2002]. Как было показано экспериментально в работе [Roosk et al., 2002], константа Михаэлиса различна в зависимости от электродного потенциала (0.03 мМ при -0.4В и 0.012 мМ при -0.3В), при этом константа оборота фермента не изменяется. Величина мембранного потенциала определяется уровнем нитрита через концентрацию фермента Nrf, поэтому в уравнении (2.7) базовой модели М1 константа Михаэлиса представлена не в виде фиксированного параметра, а как функция, зависящая от мембранного потенциала через концентрацию нитрита в хемостате:

$$Km_{Nrf} = \frac{Km_{Nrf,0} + \delta_{Km,u} \left(\frac{u}{K_{Km,u}} \right)^{h_{Km,u}}}{1 + \left(\frac{u}{K_{Km,u}} \right)^{h_{Km,u}}} \quad (2.18)$$

где $Km_{Nrf,0} = 0.012$ мМ – значение константы Михаэлиса для нитрита в присутствии низких концентраций нитрита (не выше 1 мМ), $\delta_{Km,u} = 0.03$ мМ, $K_{Km,u} = 1.15$ мМ, $h_{Km,u} = 15$ – параметры, определяющие повышение значения константы Михаэлиса при повышенных концентрациях нитрита в среде, когда влияние мембранного потенциала ослабевает.

Максимально низкое экспериментально полученное значение константы Михаэлиса было 0.012 мМ. Дальнейшее изменение потенциала электрода уже не вносило изменение в значение константы, из чего можно предположить, что это должно быть значение, приближенное к физиологическим изменениям, регистрируемым в клетке.

Расчеты модели M1 с учетом формулы (2.18) показали, что скорость утилизации нитрита Nrf редуктазой повышается только на 1.8% при добавлении в хемостат 1 мМ нитрита. Даже уменьшение константы Михаэлиса в тысячу раз, что на несколько порядков отличается от экспериментальных данных, дает увеличение скорости приблизительно на 3%. Таким образом, данный механизм не оказывает значительного влияния на активность периплазматической нитритредуктазы.

Мембранный потенциал оказывает действие не только на сродство периплазматической нитритредуктазы к субстрату, как было рассмотрено, но и позволяет ориентировать белки, проникающие через внутреннюю мембрану бактерии в пространстве для дальнейшего транспорта. Периплазматическая нитритредуктаза функционирует в периплазме, и ее транспорт осуществляется через Tat систему белков, зависящих от величины мембранного потенциала [Matos et al., 2009]. Следовательно, есть все основания предполагать, что мембранный потенциал положительно влияет на транспорт белков в периплазму, определяя уровень активных форм фермента, и тем самым повышая общую скорость утилизации нитрита через периплазматическую нитритредуктазу.

Более того, исходя из экспериментальных данных [Motteram et al., 1981], можно полагать, что максимальная скорость секреции субъединиц Nrf фермента из цитоплазмы в периплазму наблюдается в области 0.2–1 мМ концентраций нитрита, т.е. именно в той области, в которой наблюдается низкий уровень синтеза субъединиц белка Nrf, недостаточный для описания кинетики утилизации нитрита в хемостате (см. рис. 15). Поскольку объем периплазмы почти на порядок меньше объема цитоплазмы [Stock et al., 1977; Graham et al., 1991; Silhavy et al., 2010], то локальная концентрация фермента в периплазме клетки в этом интервале концентраций субстрата будет существенно выше, чем это следует из генетических исследований при расчете на весь объем клетки.

Таким образом, на основании проведенного анализа и результатов моделирования была сформулирована гипотеза, что источником дополнительной нитрит-утилизирующей активности в области микромолярных концентраций добавленного нитрита, позволяющим согласовать физиологические и генетические данные по утилизации нитрита в хемостате [Wang et al., 1999; Wang, Gunsalus 2000], является не наличие каких-либо дополнительных ферментов или регуляторов

активности Nrf редуктазы, не изменение ее каталитических свойств, а локальное изменение концентрации фермента в периплазме, возникающее в результате действия мембранного потенциала на секрецию субъединиц фермента из цитоплазмы в периплазму в области 0.2–1 мМ концентраций субстрата.

С целью проверки состоятельности гипотезы была разработана модель, в которой только два процесса – регуляция эффективности экспрессии *nrf* и *nir* оперонов и мембранный потенциал – описаны феноменологическими функциями из класса обобщенных функций Хилла [Likhoshvai et al., 2007], которые были адаптированы к экспериментальным данным [Wang et al., 1999; Motteram et al., 1981]. Остальные процессы – формирование белковых комплексов, ферментативные реакции, транспорт из цитоплазмы в периплазму, деградация белков и их комплексов – были описаны биохимическими неравновесными реакциями.

Необходимость разработки структурной модели утилизации нитрита в хемостате объясняется в первую очередь необходимостью обоснования основных положений гипотезы, сформированных на основании расчетов достаточно простой, феноменологической по сути описания процессов утилизации нитрита, модели M1, и исключения возможности артефактов в силу простоты этой модели.

2.3. Математическая модель M2 утилизации нитрита клетками *E. coli*

Математическая модель M2 утилизации нитрита культурой клеток *E. coli* в хемостате разработана на основе базовой модели M1, описанной в части 2.1. настоящей работы. Основным отличием новой модели M2 от базовой является введение зависимости транспорта субъединиц в периплазму от значения мембранного потенциала, который определяется через уровень нитрита в среде. Также, в отличие от модели M1, процессы синтеза, транспорта и сборки белковых компонентов системы утилизации нитрита описаны биохимическими реакциями в соответствии с экспериментальными данными о кинетике их протекания.

Модель утилизации нитрита M2 разработана в терминах элементарных подсистем, которые были выделены в соответствии со схемой процесса, представленной на рис. 19, и описаны ниже.

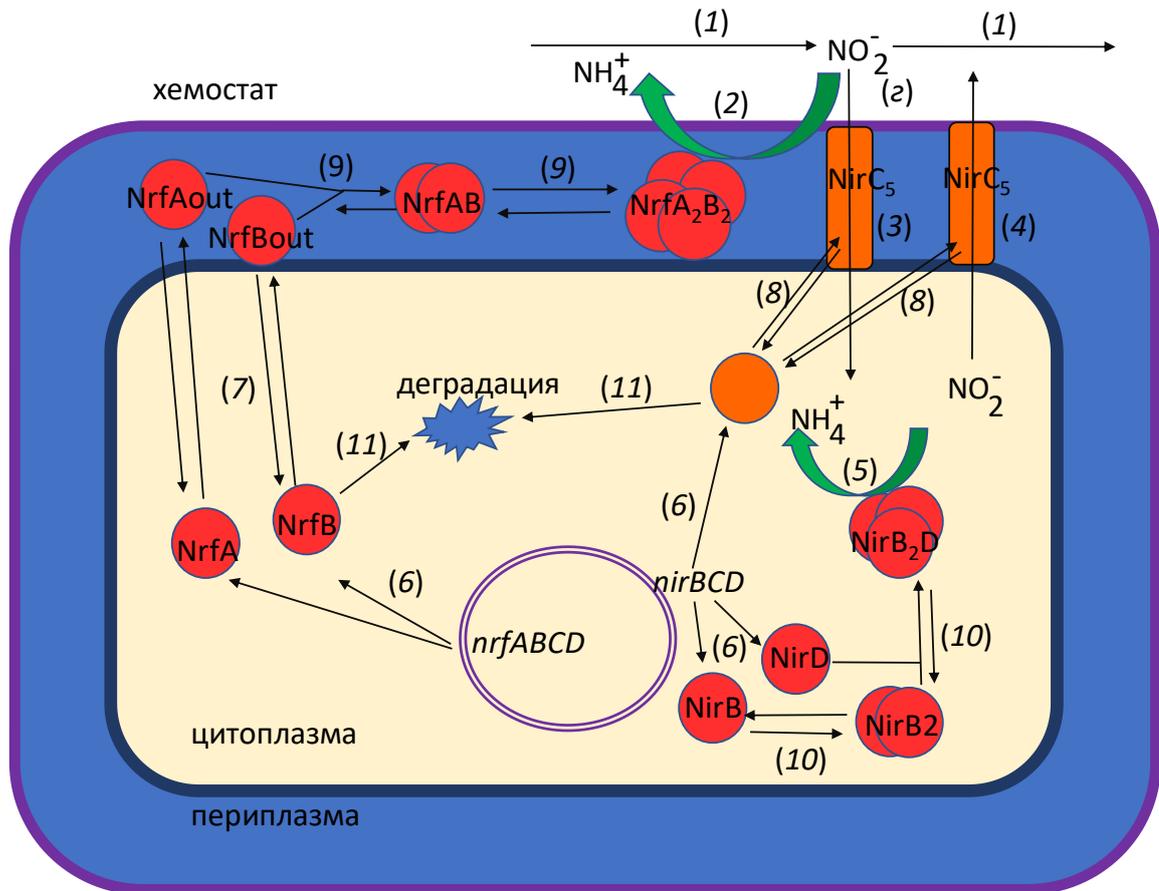


Рис. 19. Схема процессов, протекающих в хемостате при утилизации нитрита культурой клеток *E. coli*. (1) – поступление нитрита в хемостат и его вывод из хемостата с постоянной скоростью; (2) – переработка внеклеточного нитрита в аммоний периплазматической NrfAB редуктазой; (3), (4) – транспорт внеклеточного нитрита в клетку и его экспорт из клетки в хемостат NirC транспортером; (5) – утилизация внутриклеточного нитрита цитоплазматической NirB редуктазой, (6) – синтез белков NrfA, NrfB с мРНК оперона *nrf* и белков NirB, NirC, NirD с мРНК оперона *nir*; (7) – транспорт субъединиц А и В Nrf редуктазы из цитоплазмы в периплазму и обратно, (8) – формирование активной пентамерной формы NirC транспортера, (9) – формирование активной гетеротримерной формы NirB редуктазы, (10) – формирование активной гетеротетрамерной формы Nrf редуктазы, (11) – деградация белков и их комплексов (на рисунке процессы деградации показаны только для двух мономеров).

2.3.1. Подсистема переработки внеклеточного нитрита в аммоний периплазматической формат-зависимой Nrf редуктазой

Скорость переработки внеклеточного нитрита в аммоний периплазматической формат-зависимой Nrf редуктазой описана в соответствии с стехиометрической схемой $\text{NO}_2^- + 6e^- + 7\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_3 + 2\text{H}_2\text{O}$ простейшей моделью Михаэлиса-Ментен [Kemp et al., 2010; Clarke et al., 2008; van Wonderen et al., 2008]

$$\begin{cases} \frac{du}{dt} = -Ck_{dis,NrfA_2B_2u} \left(u \times NrfA_2B_2 / K_{M,Nrf} - NrfA_2B_2u \right), \\ \frac{dNrfA_2B_2}{dt} = k_{dis,NrfA_2B_2u} \left(u \times NrfA_2B_2 / K_{M,Nrf} - NrfA_2B_2u \right) - k_{cat,Nrf} NrfA_2B_2u, \\ \frac{dNrfA_2B_2u}{dt} = -k_{dis,NrfA_2B_2u} \left(u \times NrfA_2B_2 / K_{M,Nrf} - NrfA_2B_2u \right) + k_{cat,Nrf} NrfA_2B_2u, \end{cases} \quad (2.19)$$

здесь $NrfA_2B_2(u)$ – нитрит-зависимая концентрация активной формы Nrf редуктазы в периплазме клетки (выводится в подсистеме (2.29)), C – доля объема клеток популяции в объеме хемостата, $k_{cat,Nrf}$ – каталитическая константа оборота Nrf редуктазы, $K_{M,Nrf}$ – константа Михаэлиса $k_{cat,Nrf}$ – каталитическая константа оборота Nrf редуктазы, $K_{M,Nrf}$ – константа Михаэлиса.

2.3.2. Подсистема импорта внеклеточного нитрита в клетку

В модели M2, по аналогии с принципами, заложенными в модели M1, принято, что транспорт внеклеточного нитрита из среды в клетку осуществляется NirC транспортером. Скорость импорта нитрита NirC транспортером зависит от концентрации пентамерной формы комплекса $NirC_5$, при этом формируется промежуточный комплекс субстрата и фермента $NirC_5u$:

$$\begin{cases} \frac{du}{dt} = -Ck_{dis,NirC_5u} \left(u \times NirC_5 / K_{M,NirCin} - NirC_5u \right), \\ \frac{dNirC_5}{dt} = k_{dis,NirC_5u} \left(u \times NirC_5 / K_{M,NirCin} - NirC_5u \right) - k_{cat,NirCin} NirC_5u, \\ \frac{dNirC_5u}{dt} = -k_{dis,NirC_5u} \left(u \times NirC_5 / K_{M,NirCin} - NirC_5u \right) + k_{cat,NirCin} NirC_5u, \end{cases} \quad (2.20)$$

здесь $NirC_5$ – нитрит-зависимая концентрация активной формы NirC транспортера в периплазме клетки, $k_{dis,NirC_5u}$ – константа скорости диссоциации комплекса $u \times NirC_5$ на субъединицы, $k_{cat,NirCin}$ – константа скорости импорта нитрита в клетку NirC транспортером, $K_{M,NirCin}$ – константа Михаэлиса.

2.3.3. Подсистема экспорта внутриклеточного нитрита из клетки в хемостат

В модели M2 экспорт внутриклеточного нитрита из клетки в хемостат, также как и импорт, осуществляется только NirC транспортером. Процесс экспорта

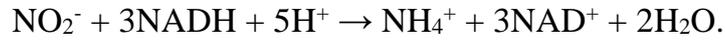
внутриклеточного нитрита (w) описывается аналогично процессу импорта через формирование промежуточного комплекса и реализацию конечного продукта – внеклеточного нитрита

$$\begin{cases} \frac{dw}{dt} = -k_{dis,NirC_5w} \left(w \times NirC_5 / K_{M,NirCout} - NirC_5 w \right), \\ \frac{dNirC_5}{dt} = k_{dis,NirC_5w} \left(w \times NirC_5 / K_{M,NirCout} - NirC_5 w \right) - k_{cat,NirCout} NirC_5 w, \\ \frac{dNirC_5 w}{dt} = -k_{dis,NirC_5w} \left(w \times NirC_5 / K_{M,NirCout} - NirC_5 w \right) + k_{cat,NirCout} NirC_5 w, \end{cases} \quad (2.21)$$

здесь w – внутриклеточная концентрация нитрита, $k_{dis,NirC_5w}$ – константа скорости диссоциации комплекса $w \times NirC_5$, $k_{cat,NirCout}$ – константа скорости экспорта нитрита из клетки NirC транспортером, $K_{M,NirCout}$ – константа Михаэлиса.

2.3.4. Подсистема утилизации внутриклеточного нитрита цитоплазматической НАДН-зависимой NirB редуктазой

В модели M2 процесс внутриклеточной утилизации нитрита описан в соответствии со следующей стехиометрической схемой



Скорость переработки вычисляется по формуле Михаэлиса-Ментен, как и в модели M1, однако описывается через формирование промежуточного комплекса $NirB_2Dw$:

$$\begin{cases} \frac{dw}{dt} = -k_{dis,NirB_2Dw} \left(w \times NirB_2D / K_{M,NirB} - NirB_2Dw \right), \\ \frac{dNirB_2D}{dt} = k_{dis,NirB_2Dw} \left(w \times NirB_2D / K_{M,NirB} - NirB_2Dw \right) - k_{cat,NirB} NirB_2Dw, \\ \frac{dNirB_2Dw}{dt} = -k_{dis,NirB_2Dw} \left(w \times NirB_2D / K_{M,NirB} - NirB_2Dw \right) + k_{cat,NirB} NirB_2Dw, \end{cases} \quad (2.22)$$

здесь $NirB_2D$ – нитрит-зависимая концентрация активной формы NirB редуктазы, $k_{dis,NirB_2Dw}$ – константа скорости диссоциации молекулярного комплекса $w \times NirB_2D$ на субъединицы, $k_{cat,NirB}$ – каталитическая константа оборота, $K_{M,NirB}$ – константа Михаэлиса.

2.3.5. Подсистема синтеза белков NrfA, NrfB, NirB, NirC и NirD

В клетке *E. coli* белки NrfA и NrfB синтезируются с мРНК *nrf* оперона, а белки NirB, NirC и NirD – с мРНК *nir* оперона. В модели M2, аналогично модели M1, концентрации мРНК *nrf* и *nir* оперонов в клетке *E. coli* пропорциональны относительным активностям химерных белков NrfA- β -gal и NirB- β -gal соответственно, и описываются обобщенными функциями Хилла $m_{Nrf}(u)$ (уравнение 2.2) и $m_{Nir}(u)$ (уравнение 2.8).

Процесс синтеза белков NrfA и NrfB описывается следующей системой дифференциальных уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dNrfA_c}{dt} = ks_{Nrf,A_c} \cdot m_{Nrf}(u), \\ \frac{dNrfB_c}{dt} = ks_{Nrf,B_c} \cdot m_{Nrf}(u). \end{cases} \quad (2.23)$$

где $NrfA_c$ и $NrfB_c$ – концентрации белков NrfA и NrfB в цитоплазме, ks_{Nrf,A_c} и ks_{Nrf,B_c} – константа скорости синтеза белков NrfA и NrfB.

Поскольку белки NirB, NirC и NirD кодируются одним опероном, то процесс их синтеза описывается системой уравнений:

$$\begin{cases} \frac{dNirB}{dt} = ks_{Nir,B} \cdot m_{Nir}(u), \\ \frac{dNirC}{dt} = ks_{Nir,C} \cdot m_{Nir}(u), \\ \frac{dNirD}{dt} = ks_{Nir,D} \cdot m_{Nir}(u). \end{cases} \quad (2.24)$$

здесь $NirB, NirC, NirD$ – концентрации белков NirB, NirC и NirD в цитоплазме соответственно, ks_{Nir} – константа скорости синтеза белков.

Тот факт, что уровень трансляции NirC белка в присутствии миллимолярных концентраций нитрита более чем в пять раз превышает таковой для NirB [Harborne et al., 1992], учитывается в соотношении значений констант синтеза белков.

2.3.6. Подсистема секреции субъединиц NrfA и NrfB Nrf нитритредуктазы из цитоплазмы в периплазму

В модели M2 принято, что Nrf фермент транспортируется из цитоплазмы в периплазму в виде мономеров, субъединиц NrfA и NrfB, синтез которых происходит в цитоплазме. Также предполагается, что константа удельной скорости транспорта мономеров A и B Nrf редуктазы из цитоплазмы, где происходит их синтез, в периплазматическое пространство, где формируется активная форма фермента, представляет переменную величину ($kt_{Nrf,cp,U}$), зависящую от величины условного мембранного потенциала. Для описания процесса транспорта субъединиц нитритредуктазы использована обобщенная функция Хилла

$$kt_{Nrf,cp,U}(U(s)) = kt_{Nrf,cp}(1 + d_U U(s)), \quad (2.24)$$

значение которой поставлено в зависимость от функции U , названной условным потенциалом. В свою очередь, функция U имитирует мембранный потенциал клетки, который изменяется в зависимости от концентрации нитрита в среде. Поскольку целью данного варианта модели M2 служит оценка возможности влияния потенциала на активность редуктазы, то в модели M2 детали механизма формирования природы мембранного потенциала в клетке *E. coli* не рассматриваются. В связи с чем для описания потенциала была использована феноменологическая функция U , которая на качественном уровне воспроизводит экспериментальные данные, полученные в работе Моттерама и коллег [Motteram et al., 1981]. Согласно этим данным наибольшее значение потенциала на мембране наблюдалось в области 0.1–1 мМ нитрита, которое было устойчиво, начиная с 0.2 мМ нитрита, и снижалось за пределами этой области. Для воспроизводства качественного поведения потенциала в зависимости от уровня добавляемого нитрита была выбрана обобщенная функция Хилла следующего вида:

$$U(s) = \frac{\left(\frac{s}{K_{pmf,1}}\right)^{h_{pmf,1}} + \delta \left(\frac{s}{K_{pmf,2}}\right)^{h_{pmf,2}}}{1 + \left(\frac{s}{K_{pmf,1}}\right)^{h_{pmf,1}} + \left(\frac{s}{K_{pmf,2}}\right)^{h_{pmf,2}}}, \quad (2.26)$$

Параметры функции $U(s)$ (табл. 5) были подобраны таким образом, чтобы поведение функции качественно соответствовало экспериментально изученному

влиянию нитрита на величину мембранного потенциала. Зависимость значения функции $U(s)$ от концентрации добавляемого нитрита показано на рис. 20.

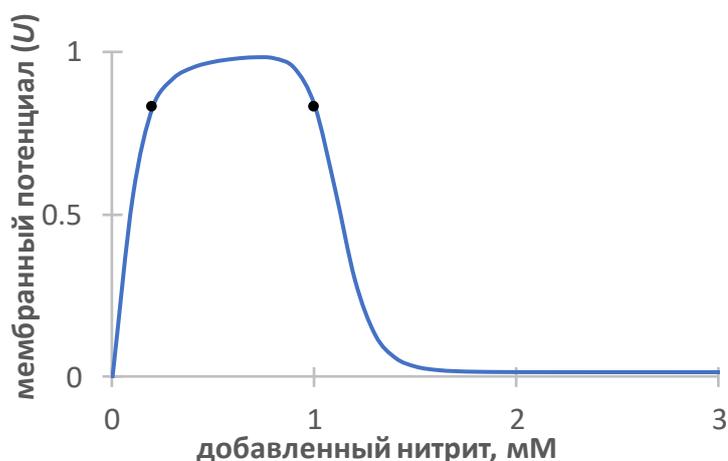


Рис. 20. Зависимость величины условного мембранного потенциала $U(s)$ от уровня добавленного нитрита. Кривая – расчет по модели M2, точки – экспериментальные данные из работы [Motteram et al., 1981]. Величина мембранного потенциала показана в условных единицах.

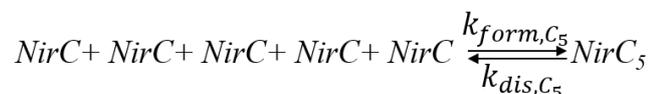
Концентрации цитоплазматических и периплазматических мономеров NrfA и NrfB зависят от величины функции транспорта $kt_{Nrf,cp,U}(U(s))$. В итоге, система дифференциальных уравнений, описывающая процесс транспорта, выглядит следующим образом:

$$\begin{cases} \frac{dNrfA_c}{dt} = -(kt_{Nrf,cp,U}(U(s)) \cdot NrfA_c - kt_{Nrf,pc} \cdot NrfA), \\ \frac{dNrfB_c}{dt} = -(kt_{Nrf,cp,U}(U(s)) \cdot NrfB_c - kt_{Nrf,pc} \cdot NrfB), \\ \frac{dNrfA}{dt} = \delta_{peripl} (kt_{Nrf,cp,U}(U(s)) \cdot NrfA_c - kt_{Nrf,pc} \cdot NrfA), \\ \frac{dNrfB}{dt} = \delta_{peripl} (kt_{Nrf,cp,U}(U(s)) \cdot NrfB_c - kt_{Nrf,pc} \cdot NrfB). \end{cases}, \quad (2.27)$$

Здесь, $NrfA_c$ и $NrfB_c$ – концентрации белков NrfA и NrfB в цитоплазме клетки, $NrfA$ и $NrfB$ – концентрации белков NrfA и NrfB в периплазме клетки, $kt_{Nrf,cp,U}$ – константа скорости транспорта белков NrfA и NrfB из цитоплазмы в периплазму, $kt_{Nrf,pc}$ – константа скорости транспорта белков NrfA и NrfB из периплазмы в цитоплазму, k_{peripl} – отношение объема цитоплазмы к периплазме.

2.3.7. Подсистема формирования активной формы NirC транспортера

В модели M2, как упоминалось ранее, принято, что NirC представляет собой пентамер, и формирование комплекса описано на основе реакции пятого порядка



Концентрации мономерной и пентамерной форм в цитоплазме записываются системой дифференциальных уравнений

$$\begin{cases} \frac{dNirC}{dt} = 5k_{dis,C_5} \left(NirC_5 - (K_{dis,C_5})^{-4} NirC^5 \right), \\ \frac{dNirC_5}{dt} = -k_{dis,C_5} \left(NirC_5 - (K_{dis,C_5})^{-4} NirC^5 \right), \end{cases} \quad (2.28)$$

Здесь, $NirC$ и $NirC_5$ – концентрации белка-мономера NirC и белка-пентамера NirC₅, k_{form,C_5} , k_{dis,C_5} – константы скоростей прямой и обратной реакций соответственно,

$K_{dis,C_5} = \sqrt[4]{\frac{k_{dis,C_5}}{k_{form,C_5}}}$ – константа диссоциации комплекса NirC₅.

2.3.8. Подсистема формирования активной формы периплазматической Nrf редуктазы

Транспортированные в периплазму мономеры NrfA и NrfB формируют гетеротетрамёрный комплекс NrfA₂NrfB₂ [Clarke et al., 2007]. В модели M2 принято, что в периплазматическом пространстве сначала формируются гетеродимеры, из которых составляется гетеротетрамеры согласно схеме (2.3) модели M1. Однако, в отличие от M1, в модели M2 процесс комплексообразования NrfAB и NrfA₂B₂ белков проходит в периплазме и, как следствие, концентрация комплексов зависит от уровня периплазматических мономеров. Процесс формирования комплексов записывается как система дифференциальных уравнений, в которой учитывается их деградация:

$$\begin{cases} \frac{dNrfA}{dt} = k_{dis,AB} (NrfAB - K_{dis,AB}^{-1} NrfA \cdot NrfB), \\ \frac{dNrfB}{dt} = k_{dis,AB} (NrfAB - K_{dis,AB}^{-1} NrfA \cdot NrfB), \\ \frac{dNrfAB}{dt} = -k_{dis,AB} (NrfAB - K_{dis,AB}^{-1} NrfA \cdot NrfB) + 2k_{dis,A_2B_2} (NrfA_2B_2 - K_{dis,A_2B_2}^{-1} NrfAB^2), \\ \frac{dNrfA_2B_2}{dt} = -k_{dis,A_2B_2} (NrfA_2B_2 - K_{dis,A_2B_2}^{-1} NrfAB^2), \end{cases} \quad (2.29)$$

здесь $NrfA$, $NrfB$ – концентрации в периплазме свободных белков-мономеров $NrfA$ и $NrfB$, $NrfAB$ – концентрация в периплазме комплекса $NrfAB$, $NrfA_2B_2$ – концентрация активной гетеротетрамерной формы $NrfA_2B_2$ фермента Nrf , $k_{form,AB}$, k_{form,A_2B_2} и $k_{dis,AB}$, k_{dis,A_2B_2} – константы прямой и обратной реакций соответственно, $K_{dis,AB} = \frac{k_{form,AB}}{k_{dis,AB}}$, $K_{dis,A_2B_2} = \frac{k_{form,A_2B_2}}{k_{dis,A_2B_2}}$ – константы диссоциации комплексов $NrfAB$ и $NrfA_2B_2$.

2.3.9. Подсистема формирования активной формы цитоплазматической NirB редуктазы

Активная форма цитоплазматической нитритредуктазы представляет из себя гетеротримерный комплекс $NirB_2NirD$, который формируется из мономеров согласно схеме (2.9) модели M1. Исходя из этого, система ОДУ, описывающая процесс формирования комплексов $NirB_2$ и $NirB_2NirD$ и деградацию этих комплексов и белков $NirB$ и $NirD$ в цитоплазме, выглядит следующим образом:

$$\begin{cases} \frac{dNirB}{dt} = 2k_{dis,B_2} (NirB_2 - K_{dis,B_2}^{-1} NirB^2), \\ \frac{dNirB_2}{dt} = -k_{dis,B_2} (NirB_2 - K_{dis,B_2}^{-1} NirB^2) + k_{dis,B_2D} (NirB_2D - K_{dis,B_2D}^{-1} NirB_2 \times NirD), \\ \frac{dNirD}{dt} = k_{dis,B_2D} (NirB_2D - K_{dis,B_2D}^{-1} NirB_2 \times NirD), \\ \frac{dNirB_2D}{dt} = -k_{dis,B_2D} (NirB_2D - K_{dis,B_2D}^{-1} NirB_2 \times NirD), \end{cases} \quad (2.31)$$

здесь, $NirB$, $NirD$ – внутриклеточные концентрации белков-мономеров $NirB$ и $NirD$, $NirB_2$ – внутриклеточная концентрация димера $NirB_2$, $NirB_2D$ – внутриклеточная концентрация активной формы цитоплазматической

нитритредуктазы, которой является тример NirB₂D, $k_{dis,B_2}, k_{form,B_2}, k_{dis,B_2}, k_{form,B_2}$
 константы скоростей прямых и обратных реакций, $K_{dic,B_2} = \frac{k_{dis,B_2}}{k_{form,B_2}}, K_{dic,B_2D} = \frac{k_{dis,B_2D}}{k_{form,B_2D}}$
 – константы диссоциации комплексов NirB₂ и NirB₂NirD.

2.3.10. Подсистема процессов деградации и разбавления концентрации белков и их комплексов в процессе роста клеток

В модели M2 процессы деградации белков и их комплексов описаны на основе линейной мономолекулярной реакции. Скорость разбавления внутриклеточной концентрации вещества за счет роста клеток, имеющего концентрацию x , в общем виде равняется $(V'/V)x$, где V – текущий объем клетки, а V' – скорость роста объема клетки. Принимая во внимание, что в хемостате скорость роста синхронизирована со скоростью оттока, усредненное значение константы скорости роста клетки равняется константе скорости оттока [Wang et al., 1999], что позволяет записать подмодель для выведения вещества из системы в следующем виде

$$\frac{dx}{dt} = -(k_{d,x} + k_{flow}) \cdot x, \quad (2.32)$$

где $k_{d,x}$ – константы деградации вещества x , вместо x выступают переменные $w, NrfA_c, NrfB_c, NrfA, NrfB, NirC, NirB, NirD, NrfAB, Nrf, NrfA_2B_2, NirB_2, NirB_2D,$

2.3.11. Подсистема протока нитрита через хемостат

Скорость поступления нитрита в хемостат является постоянной, а скорость его вывода из хемостата пропорциональна текущей концентрации, поэтому суммарная скорость протока нитрита через хемостат описывается уравнением

$$\frac{du}{dt} = kflow \cdot s - kflow \cdot u, \quad (2.33)$$

где u – внеклеточная концентрация нитрита в хемостате, $kflow$ (сек⁻¹) – константа скорости оттока нитрита из хемостата, s – концентрация добавленного нитрита.

2.3.12. Модель утилизации нитрита, учитывающая влияние мембранного потенциала на транспорт периплазматических белков NrfA и NrfB

Система утилизации нитрита, описанная в начале параграфа 2.3 и изображенная в виде схемы на рис. 19, представляет собой совокупность процессов протока субстрата через хемостат (2.33) и процессов, описывающих отдельные реакции, происходящие в бактериальной клетке в присутствии нитрита: утилизации

нитрита за счет Nrf редуктазы в клетках бактерий *E. coli*, импорта субстрата внутрь культуры клеток и экспорта внутриклеточного нитрита в хемостат, а также утилизации внутриклеточного субстрата NirB редуктазой (подсистемы (2.19)–(2.32)).

В процессах нитритной подсистемы задействованы различные вещества: внеклеточный и внутриклеточный нитрит, белки и их комплексы, которые в модели являются переменными. Для каждой такой переменной, согласно закону суммирования локальных скоростей, было составлено дифференциальное уравнение, описывающее кинетику изменения концентрации соответствующего вещества как суммы локальных скоростей процессов, в которых принимает участие это вещество. Например, динамика изменения концентрации нитрита в хемостате равна сумме скоростей притока субстрата (скорости поступления в хемостат (2.33) и экспорта нитрита из клетки (2.21)) за минусом скоростей оттока нитрита (скорости утилизации субстрата Nrf редуктазой (2.19) и импорта в бактериальную клетку (2.30)).

Итоговая система дифференциальных уравнений, описывающая все процессы, проходящие в хемостате и бактериальных клетках, будет иметь вид:

$$\begin{aligned}
\frac{du}{dt} &= k_{flow}(s-u) + C \cdot \left[k_{dis,NrfA_2B_2u} (NrfA_2B_2u - K_{dis,NrfA_2B_2u}^{-1} NrfA_2B_2 \times u) + \right. \\
&\quad \left. + k_{dis,NirC_5} (NirC_5 - K_{dis,NirC_5}^{-1} NirC_5 \times u) + k_{cat,NirCout} NirC_5 w \right], \\
\frac{dw}{dt} &= k_{cat,NirCin} NirC_5 u + k_{dis,NirC_5w} (NirC_5 w - K_{dis,NirC_5w}^{-1} NirC_5 \times w) + \\
&\quad + k_{dis,NirB_2Dw} (NirB_2Dw - K_{dis,NirB_2Dw}^{-1} NirB_2D \times w) - k_{flow} \cdot w, \\
\frac{dNirC}{dt} &= ks_{Nir} m_{Nir}(u) + 5k_{dis,NirC_5} (NirC_5 - K_{dis,NirC_5}^{-4} NirC^5) - (k_{d,NirC} + k_{flow}) NirC, \\
\frac{dNirC_5}{dt} &= k_{cat,NirCin} NirC_5 u + k_{cat,NirCout} NirC_5 w - k_{dis,NirC_5} (NirC_5 - K_{dis,NirC_5}^{-4} NirC^5) - \\
&\quad - k_{dis,NirC_5u} (NirC_5 u - K_{dis,NirC_5u}^{-1} NirC_5 \times u) - k_{dis,NirC_5w} (NirC_5 w - K_{dis,NirC_5w}^{-1} NirC_5 \times w) - (k_{d,NirC_5} + k_{flow}) NirC_5, \\
\frac{dNirC_5u}{dt} &= -k_{dis,NirC_5u} (NirC_5 u - K_{dis,NirC_5u}^{-1} NirC_5 \times u) - (k_{cat,NirCin} + k_{flow}) NirC_5 u, \\
\frac{dNirC_5w}{dt} &= -k_{dis,NirC_5w} (NirC_5 w - K_{dis,NirC_5w}^{-1} NirC_5 \times w) - (k_{cat,NirCout} + k_{flow}) NirC_5 w, \\
\frac{dNirB}{dt} &= ks_{Nir} m_{Nir}(u) + 2k_{dis,NirB_2} (NirB_2 - K_{dis,NirB_2}^{-1} NirB^2) - (k_{d,NirB} + k_{flow}) NirB, \\
\frac{dNirD}{dt} &= ks_{Nir} m_{Nir}(u) + k_{dis,NirB_2D} (NirB_2D - K_{dis,NirB_2D}^{-1} NirB_2 \times NirD) - (k_{d,NirD} + k_{flow}) NirD, \\
\frac{dNirB_2}{dt} &= k_{dis,NirB_2} (NirB_2 - K_{dis,NirB_2}^{-1} NirB^2) + \\
&\quad + k_{dis,NirB_2D} (NirB_2D - K_{dis,NirB_2D}^{-1} NirB_2 \times NirD) - (k_{d,NirB_2} + k_{flow}) NirB_2, \\
\frac{dNirB_2D}{dt} &= -k_{dis,NirB_2D} (NirB_2D - K_{dis,NirB_2D}^{-1} NirB_2 \times NirD) + k_{cat,NirB} NirB_2Dw + \\
&\quad + k_{dis,NirB_2Dw} (NirB_2Dw - K_{dis,NirB_2Dw}^{-1} NirB_2D \times w) - (k_{d,NirB_2D} + k_{flow}) NirB_2D, \\
\frac{dNirB_2Dw}{dt} &= -k_{dis,NirB_2Dw} (NirB_2Dw - K_{dis,NirB_2Dw}^{-1} NirB_2D \times w) - (k_{cat,NirB} + k_{flow}) NirB_2Dw, \\
\frac{dNrfA_c}{dt} &= ks_{Nrf} m_{Nrf}(u) - (kt_{Nrf,cp,U}(U(s))NrfA_c - kt_{Nrf,pc}NrfA) - (k_{d,NrfA_c} + k_{flow}) NrfA_c, \\
\frac{dNrfB_c}{dt} &= ks_{Nrf} m_{Nrf}(u) - (kt_{Nrf,cp,U}(U(s))NrfB_c - kt_{in,pc}NrfB) - (k_{d,NrfB_c} + k_{flow}) NrfB_c, \\
\frac{dNrfA}{dt} &= \delta_{peripl} \cdot (kt_{Nrf,cp,U}(U(s))NrfA_c - kt_{Nrf,pc}NrfA) \\
&\quad + k_{form,NrfAB} (K_{dis,NrfAB} NrfAB - NrfA \cdot NrfB) - (k_{d,NrfA} + k_{flow}) NrfA, \\
\frac{dNrfB}{dt} &= \delta_{peripl} \cdot (kt_{Nrf,cp,U}(U(s))NrfB_c - kt_{Nrf,pc}NrfB) \\
&\quad + k_{form,NrfAB} (K_{dis,NrfAB} NrfAB - NrfA \cdot NrfB) - (k_{d,NrfB} + k_{flow}) NrfB, \\
\frac{dNrfAB}{dt} &= 2k_{dis,NrfA_2B_2} (NrfA_2B_2 - K_{dis,NrfA_2B_2}^{-1} (NrfAB)^2) \\
&\quad - k_{dis,NrfAB} (NrfAB - K_{dis,NrfAB}^{-1} NrfA \cdot NrfB) - (k_{d,NrfAB} + k_{flow}) NrfAB, \\
\frac{dNrfA_2B_2}{dt} &= k_{dis,NrfA_2B_2u} (NrfA_2B_2u - K_{dis,NrfA_2B_2u}^{-1} NrfA_2B_2 \times u) + k_{cat,NrfA_2B_2u} NrfA_2B_2u - \\
&\quad - k_{dis,NrfA_2B_2} (NrfA_2B_2 - K_{dis,NrfA_2B_2}^{-1} (NrfAB)^2) - (k_{d,NrfA_2B_2} + k_{flow}) NrfA_2B_2, \\
\frac{dNrfA_2B_2u}{dt} &= -k_{dis,NrfA_2B_2u} (NrfA_2B_2u - K_{dis,NrfA_2B_2u}^{-1} NrfA_2B_2 \times u) - (k_{cat,NrfA_2B_2u} + k_{flow}) NrfA_2B_2u.
\end{aligned} \tag{2.34}$$

Система уравнений (2.34) в дальнейшем будет называться моделью M2.

В отличие от модели M1, в которой концентрации белковых комплексов рассматриваются в стационаре, в модели M2 процессы синтеза, транспорта и комплексообразования рассматриваются в динамике.

2.3.13. Оценка параметров модели

Полный список параметров модели M2 и их значения, использованные в расчетах, приведены в табл. 5. Значения параметров, входящих в состав функций $m_{Nrf}(u)$ (подсистема 2.2) и $m_{Nir}(u)$ (подсистема 2.8), идентичны значениям, оцененным для модели M1 (см параграфы 2.2.2 и 2.2.3), и приведены в таблице параметров к модели M1 (табл. 3). Параметр скорости протока субстрата через хеостат (k_{flow}) и параметр доли культуры клеток (C) также приведены в таблице 3.

Для оценки параметров функции $U(s)$, описывающей поведение мембранного потенциала в зависимости от концентрации нитрита, были использованы данные [Motteram et al., 1981] (см. параграф 2.3.6)).

Поскольку мономеры периплазматической редуктазы при транспорте проходят из цитоплазмы в периплазму, объемы которых отличаются, в модель M2 был введен множитель δ_{peripl} , отражающий отношение объема цитоплазмы к периплазме. Согласно экспериментальным данным, доля периплазматического пространства составляет 8–40% от объема всей клетки *E. coli* [Wright, Lockhart, 1965; Graham et al., 1991; Stock et al., 1977], что позволило оценить интервал значений, который может принимать параметр δ_{peripl} ($\delta_{peripl} = 2.5–12.5$). В модели значение этого параметра принято равным 6 (табл. 5).

Оценка скоростей деградации белков NrfA, NrfB, NirB, NirD, NirC и их комплексов основывается на данных о среднем времени полужизни общего пула цитоплазматических белков *E. coli*, равного двум часам [Mosteller et al., 1980], и стабильности периплазматической фракции белковых комплексов, которая на порядок выше [Talmadge, Gilbert 1982].

Значения констант скоростей формирования комплексов NrfAB, NrfA₂B₂, NirC₅, NirB₂ и NirB₂D оценены на основании косвенных данных по кинетике белок-белковых взаимодействий [Northrup, Erickson, 1992].

Значения констант скоростей диссоциации для димерной и тетрамерной форм Nrf редуктазы определены из экспериментальных данных [Clarke et al., 2007].

Значения остальных параметров, которые не были оценены на основе экспериментальных данных, были подобраны в процессе адаптации модели к данным экспериментов по накоплению нитрита в хемостате [Wang et al., 1999].

Таблица 5 Список параметров модели M2

Параметр	Название параметра	Значения параметров	Номер уравнения	Литературная ссылка
$k_{S_{Nrf,Ac}} = k_{S_{Nrf,Bc}}$	Максимальная удельная скорость синтеза белков NrfA и NrfB	$6.6 \cdot 10^{-6}$ мМ/сек	2.23	[*]
$k_{S_{NirC}}$	Максимальная удельная скорость синтеза белка NirC	$3.2 \cdot 10^{-5}$ мМ/сек	2.24	[*]
$k_{S_{NirB}} = k_{S_{NirD}}$	Максимальные удельные скорости синтеза белков NirB и NirD	$k_{S_{NirC}}/5$	2.24	[*]
$k_{d,Nrf}$	Константа скорости деградации мономеров Nrf A и B в цитоплазме	$9.6 \cdot 10^{-5}$ сек ⁻¹	2.32	[Talmadge, Gilbert, 1982]
$kt_{Nrf,cp}$	Константа скорости секреции NrfA и NrfB в периплазму	0.0588 сек ⁻¹	2.25	[*]
$kt_{Nrf,pc}$	Константа скорости транспорта NrfA и NrfB в цитоплазму	10 сек ⁻¹	2.27	
$k_{dis,NrfAB}$	Константа скорости диссоциации димера NrfAB до мономеров NrfA и NrfA B	10 сек ⁻¹	2.29	
$K_{dis,NrfAB}$	Равновесная константа диссоциации димеров NrfAB	0.00004 мМ	2.29	[Clarke et al., 2007]
$k_{dis,NrfA_2B_2}$	Константа скорости диссоциации Nrf(AB) ₂ на две субъединицы белка-димера NrfAB	10 сек ⁻¹	2.29	[*]
$K_{dis,NrfA_2B_2}$	Равновесная константа диссоциации тетрамеров NrfA ₂ B ₂	0.004 мМ	2.29	[Clarke et al., 2007]
δ_{peripl}	Константа отношения объема цитоплазмы к периплазме	6	2.27	[Graham et al., 1991]
d_U	Параметры, входящие в обобщенную функцию U , описывающую зависимость относительной величины мембранного потенциала от добавленной в хемостат концентрации нитрита	0.21	2.25	[Motteram et al., 1981]
δ		0.009	2.26	
$K_{pmf,1}$		0.115 мМ	2.26	
$h_{pmf,1}$		2		
$K_{pmf,2}$		0.82 мМ		
$h_{pmf,2}$		16		
$K_{d,NrfA} = K_{d,NrfB} = K_{d,NrfAB} = K_{d,NrfA_2B_2}$	Константа скорости деградации мономеров NrfA и NrfB, NrfAB, NrfA ₂ B ₂	$9.6 \cdot 10^{-6}$ сек ⁻¹	2.32	[Talmadge, Gilbert, 1982]
$k_{cat,NrfA_2B_2u}$	Константа скорости оборота редуктазы NrfA	700 сек ⁻¹	2.19	[Kemp et al., 2010]
$K_{dis,NrfA_2B_2u} = K_{M,Nrf}$	Константа Михаэлиса редуктазы Nrf для нитрита	0.03 мМ	2.19	[Clarke et al., 2008]
$k_{dis,NirB_2}$	Константа скорости диссоциации NirB ₂ на два мономера	10 сек ⁻¹	2.31	[*]
$K_{dis,NirB_2}$	Равновесная константа диссоциации реакции формирования NirB ₂	0.001 мМ	2.31	[*]
k_{dis,B_2D}	Константа скорости диссоциации NirB ₂ D на димер NirB ₂ и NirD	10 сек ⁻¹	2.31	[*]
$K_{dis,NirB_2D}$	Равновесная константа диссоциации реакции формирования тримера NirB ₂ D	0.001 мМ	2.31	[*]

$k_{cat,NirB_2Dw}$	Константа скорости каталитического оборота фермента NirB	1100 сек ⁻¹	2.22	[*]
$k_{dis,NirB_2Dw}$	Константа скорости диссоциации молекулярного комплекса NirB ₂ D и внутриклеточного нитрита (NirB ₂ Dw) на субъединицы	10 сек ⁻¹	2.22	[*]
$K_{dis,NirB_2Dw} = K_{M,NirB}$	Константа Михаэлиса фермента NirB	0.006 мМ	2.22	[Coleman et al., 1978]
k_{dis,C_5}	Константа скорости диссоциации молекулярного комплекса NirC ₅ на мономеры	10 сек ⁻¹	2.28	
$K_{dis,NirC_5}$	Константа скорости диссоциации NirC ₅	0.01 мМ	2.28	[*]
$k_{cat,NirCin}$	Каталитическая константа скорости импорта нитрита в клетку белком NirC	42 сек ⁻¹	2.20	[*] ⁶
$k_{dis,NirC_5u}$	Константа скорости диссоциации молекулярного комплекса NirC ₅ и внеклеточного нитрита (NirC ₅ u) на субъединицы	10 сек ⁻¹	2.20	
$K_{dis,NirC_5u} = K_{M,NirCin}$	Константа Михаэлиса процесса импорта нитрита в клетку белком NirC	0.3 мМ	2.20	[Rycovska et al., 2012]
$k_{cat,NirCout}$	Каталитическая константа скорости экспорта нитрита из клетки белком NirC	200 сек ⁻¹	2.21	[*]
$k_{dis,NirC_5w}$	Константа скорости диссоциации молекулярного комплекса NirC ₅ и внутриклеточного нитрита (NirC ₅ w) на субъединицы	10 сек ⁻¹	2.21	[*] ⁶
$K_{dis,NirC_5w}$	Константа Михаэлиса процесса экспорта нитрита из клетки белком NirC	0.3 мМ	2.21	[Rycovska et al., 2012]
$k_{d,NirC}$	Константа скорости деградации мономера NirC	0.0011 сек ⁻¹	2.32	[*]
$k_{d,NirC_5}$	Константа скорости деградации пентамера NirC ₅	0.00011 сек ⁻¹	2.32	[*]
$k_{d,NirB}$	Константа скорости деградации мономера NirB	0.00011 сек ⁻¹	2.32	[*]
$k_{d,NirD}$	Константа скорости деградации мономера NirD	0.00011 сек ⁻¹	2.32	[*]
$k_{d,NirB_2}$	Константа скорости деградации димера NirB ₂	0.000011 сек ⁻¹	2.32	[*]
$k_{d,NirB_2D}$	Константа скорости деградации димера NirB ₂ D	0.000011 сек ⁻¹	2.32	[*]

Размерность параметров обозначена: мМ – миллимоль на литр, сек – секунды, если размерность не указана, то величина является безразмерной.

* – значение константы подобрано в результате численных экспериментов.

2.3.14. Оценка скоростей транспорта и утилизации нитрита

На основе экспериментальных данных по регуляции экспрессии *nrf* и *nir* оперонов, кодирующих субъединицы Nrf и NirB редуктаз и NirC транспортера [Wang, Gunsalus, 2000], и данных по скорости утилизации нитрита культурой клеток *E. coli* в хемостате [Wang et al., 1999], была проведена адаптация математической модели M2, что позволило оценить вклад различных компонентов системы в утилизацию нитрита и контроль его внутриклеточного содержания.

Как можно видеть из результатов расчета модели M2, приведенных на рис. 21, заложенные в модель механизмы и постулаты позволили достичь хорошей степени адаптации модели к экспериментальным данным по динамике накопления нитрита в хемостате (рис. 21а). Значение *CKO* для модели M2 равно 0.01, что в шесть раз меньше, чем рассчитанное значение для M1. Максимальное значение внутриклеточной концентрации нитрита в исследуемом интервале добавленного в хемостат нитрита не превышает 30 мкМ (рис. 21б), что качественно соответствует экспериментальным данным о поддержании достаточно низкой, менее 0.1 мМ, концентрации нитрита в клетке в условиях анаэробного роста культуры клеток *E. coli* на 20 мМ нитрате, когда концентрация нитрита в ростовой среде достигает 5 мМ [Clegg et al., 2002].

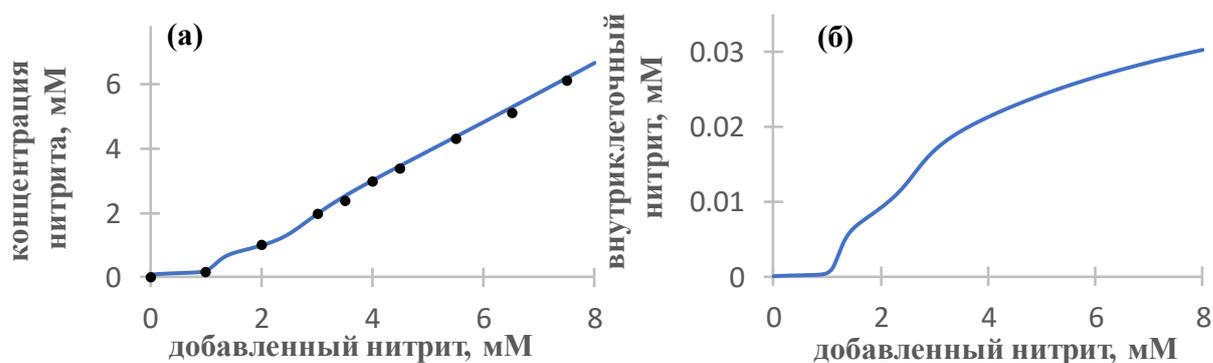


Рис. 21. Зависимость стационарной концентрации нитрита в хемостате (а) и внутри клетки (б) от уровня добавленного нитрита. Кривая – расчет по модели M2, точки – экспериментальные данные из работы [Wang et al. 1999], Ось абсцисс – концентрация добавленного в хемостат нитрита (мМ), оси ординат: (а) – стационарная концентрация нитрита в хемостате (мМ), (б) – концентрация нитрита в клетке (мМ). Значения параметров приведены в табл. 5.

В результате анализа модели M2 была проведена оценка вклада различных компонентов системы утилизации нитрита при различных концентрациях добавленного нитрита (рис. 22, кривые 1–5). Вклад периплазматической Nrf редуктазы и цитоплазматической NirV редуктазы показаны на рис. 22 кривыми 1 и 4. Общая скорость утилизации нитрита в хемостате (рис. 22, кривая 5) складывается из активности Nrf редуктазы (рис. 22, кривая 1) и скорости импорта нитрита в клетку (рис. 22, кривая 2) за вычетом скорости экспорта субстрата из клетки (рис. 22, кривая 3).

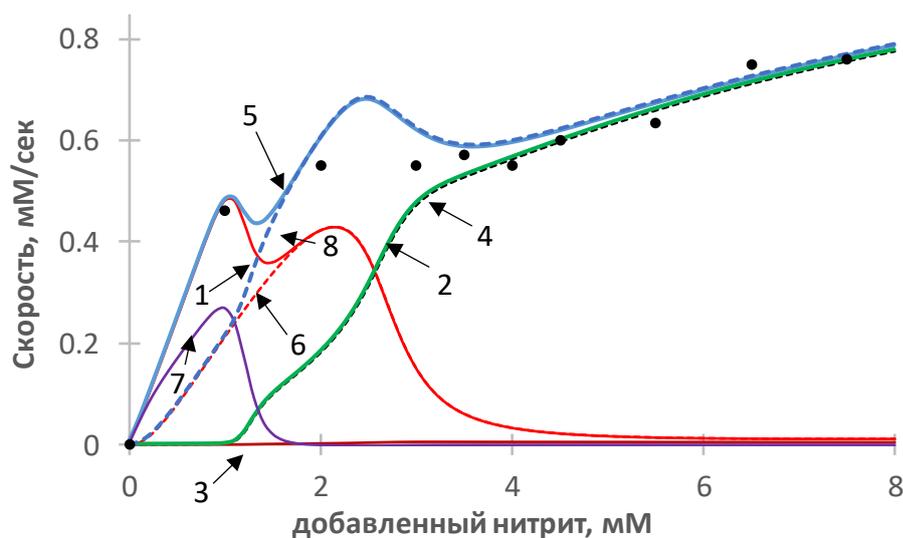


Рис. 22. Вклад различных компонентов системы утилизации и транспорта нитрита в динамику его накопления в хемостате. Точки – экспериментальные данные по скорости утилизации нитрита популяцией клеток, вычисленные по формуле $k_{flow}(s-u)/C$ на основе данных работы [Wang et al., 1999], кривые 1–5 – расчет по модели M2, кривые 6–8 – расчет по модели M2*. Кривая 1 – скорость утилизации нитрита периплазматической Nrf редуктазой, кривая 2 (штриховая) – скорость импорта нитрита в клетку NirC транспортером; кривая 3 – скорость экспорта нитрита из клетки NirC транспортером, измеряемая в отрицательных единицах; кривая 4 – скорость утилизации нитрита цитоплазматической NirB редуктазой; кривая 5 – суммарная скорость утилизации нитрита Nrf и NirB редуктазами; кривая 6 – скорость переработки нитрита Nrf редуктазой, рассчитанная по модели M2, без учета влияния мембранного потенциала ($dU=0$) на скорость секреции белков NirA и NirB и $kt_{Nrf,cp}=0.055\text{сек}^{-1}$; кривая 7 – разность между кривыми 1 и 6; кривая 8 – суммарная скорость переработки нитрита клеткой, рассчитанная по M2*. Значения остальных параметров представлены в табл. 5. Ось абсцисс – концентрация добавленного нитрита (мМ), ось ординат – скорость переработки нитрита (мМ/сек).

Результаты расчетов модели M2 по аналогии с моделью M1 позволяют выделить две условные области – область малых значений нитрита (примерно до 1.25 мМ), и область высоких значений субстрата (больше 3.5 мМ), в которых нитрит утилизируется только периплазматической или цитоплазматической нитритредуктазами соответственно. Наличие двух областей нитрита обусловлено особенностями функционирования *nrf* и *nir* оперонов, кодирующих структуру двух нитритредуктаз, активность которых зависит от концентрации нитрита [Wang et al., 1999].

В области высоких значений добавленного в хемостат нитрита (больше 3.5 мМ) наблюдается высокая эффективность переработки нитрита NirB редуктазой (рис. 22, кривая 4), активности которой достаточно для описания экспериментально наблюдаемой скорости утилизации нитрита культурой клеток *E. coli*, при этом уровень активности периплазматической редуктазы низкий (рис. 22, кривая 1), что

вполне согласуется с динамикой экспрессии оперонов [Wang et al., 1999], кодирующих субъединицы нитритредуктаз.

В ходе анализа потоков транспорта нитрита в модели M1 было выделено несколько возможных сценариев, согласно которым внутриклеточный нитрит или утилизируется преимущественно NirB редуктазой, или частично выводится в окружающую среду, т.е. в хеостат. В ходе адаптации модели M2 также был проведен анализ скоростей транспорта и детоксификации нитрита за счет варьирования параметров, входящих в соответствующие подсистемы модели M2. Результаты расчетов модели M2, приведенные на рис. 22, были получены с использованием набора параметров, при котором реализуется высокая импорт-зависимая скорость внутриклеточного восстановления нитрита до аммония (рис. 22, кривая 4), определяющая крайне низкую скорость экспорта нитрита из клетки (рис. 22, кривая 3). Соотношение скоростей импорта, экспорта и цитоплазматической утилизации нитрита определяется кинетическими характеристиками участвующих в указанных процессах белковых комплексов, оцененных по экспериментальным данным.

Для описания кинетики транспорта нитрита бактерией *E. coli* было использовано значение константы Михаэлиса, равное 0.3 мМ, близкое к значению, полученному для *Salmonella typhimurium* [Rycovska et al., 2012]. Такое значение константы Михаэлиса не приводит к ограничению скорости транспорта, поскольку стационарные концентрации нитрита в хеостате, при которых функционирует транспортная система, выше 0.3 мМ [Wang, Gunsalus, 2000]. Принятые в модели значения параметров, входящие в уравнение скорости импорта и цитоплазматической утилизации нитрита [Rycovska et al., 2012; Coleman et al., 1978], обуславливают низкую стационарную концентрацию нитрита внутри клетки до 30 мкМ при s больше 3.5 мМ (рис. 21б), что не превышает порог токсичности для клетки [Clegg et al., 2002]. Высокая скорость цитоплазматической утилизации нитрита и, как следствие, низкий уровень токсичного нитрита в клетке предопределяет низкую экспортную активность NirC транспортера согласно расчетам модели. Несмотря на то что экспериментальных данных для характеристик скорости экспорта для нитрита в условиях проточного хеостата нет, однако

данные, полученные для периодической культуры клеток *E. coli*, показали наличие экспортной активности нитрита за счет NirC транспортера [Jia et al., 2009].

В связи с этим был рассмотрен другой вариант набора параметров с более низким значением константы Михаэлиса для транспорта нитрита, чем измеренное для *S. typhimurium*, а различия кинетических характеристик транспортеров для различных видов бактерий могут объясняться отличиями в структуре и механизме функционирования гомологичных белков. Обоснованием выбора низких значений константы Михаэлиса для транспорта нитрита являются данные о низких концентрациях внутриклеточного нитрита [Clegg et al., 2002], которые могут свидетельствовать о том, что предел токсичности клеток по отношению к нитриту лежит в области микромолярных концентраций нитрита. Исходя из этого, был рассмотрен вариант модели, в котором значение константы Михаэлиса для экспорта нитрита из клетки NirC транспортером в 100 раз меньше – $K_{M,NirC,out} = 0.003$ мкМ. Соответствующий расчет представлен на рис. 23.

Расчеты показали, что параметрический вариант с низким значением константы Михаэлиса для транспорта нитрита описывает экспериментально наблюдаемую кинетику по общей скорости утилизации нитрита, но при этом для системы транспорта характерна высокая скорость экспорта нитрита из клетки в хемостат (рис. 23, кривая 5).

Следовательно, соотношение импортной/экспортной функций фермента NirC в модели M2 является свободным параметром, как и в модели M1, что позволяет получить представление о внутриклеточной концентрации нитрита скорее на качественном уровне, чем на количественном, и для установления его значения необходимы дополнительные данные, которые пока отсутствуют в научной литературе.

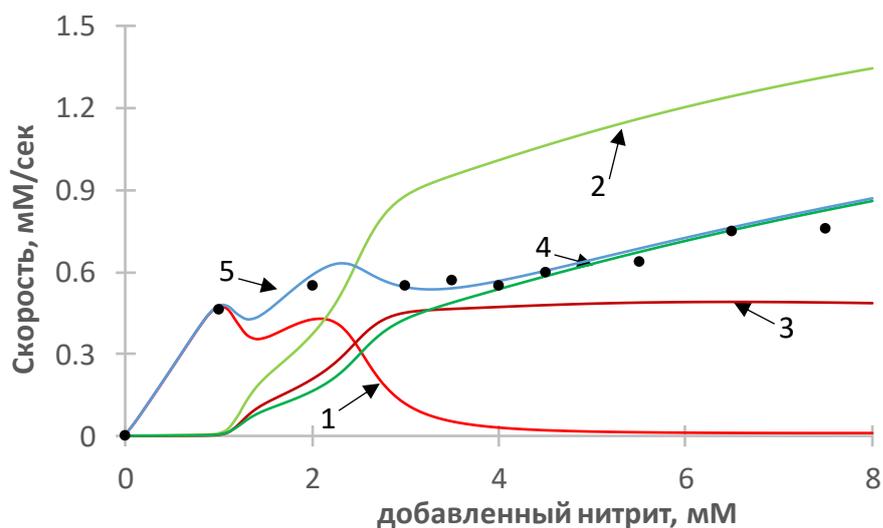


Рис. 23. Зависимость скорости утилизации и транспорта нитрита от концентрации добавленного в хеостат субстрата. Точки – скорость потребления нитрита клеткой, вычисленная на основе экспериментальных данных из [Wang, Gunsalus, 2000]. Кривая 1 – скорость утилизации нитрита периплазматической Nrf редуктазой; кривая 2 – скорость импорта нитрита в клетку NirC транспортером; кривая 3 – скорость экспорта нитрита из клетки NirC транспортером, измеряемая в отрицательных единицах; кривая 4 – скорость утилизации нитрита цитоплазматической NirB редуктазой, кривая 5 – суммарная скорость утилизации нитрита NrfA и NirB редуктазами. Расчёт по варианту модели M2, в котором $K_{M,NirC,out}=0.003$ мМ, $k_{s,NirC,0}=5.1 \cdot 10^{-5}$ мМ/сек, значения остальных параметров взято из табл. 5. Ось абсцисс – концентрация добавленного нитрита, ось ординат – скорость утилизации/транспорта нитрита (мМ/сек).

2.3.15. Оценка вклада различных механизмов регуляции активности периплазматической Nrf редуктазы в утилизацию нитрита

В области низких значений концентрации добавленного нитрита ($s < 1.25$ мМ) поступающий в хеостат субстрат утилизируется только периплазматической Nrf редуктазой (рис. 22, при s меньше 1.25 кривая 1 совпадает с кривой 5). Высокая активность Nrf редуктазы обеспечивается суммарным эффектом, который достигается как за счет активации экспрессии *nrf* оперона при синтезе белков NrfA и NrfB *de novo*, так и за счет увеличения скорости секреции белков NrfA и NrfB из цитоплазмы в периплазму в результате формирования электрического потенциала U на мембране клетки (рис. 20). Анализ математической модели M2 позволяет оценить потенциальный вклад каждого механизма в формирование скорости утилизации нитрита периплазматической нитритредуктазой.

Для оценки вклада механизмов регуляции экспрессии *nrf* оперона, кодирующего структуру Nrf редуктазы, в утилизацию нитрита в хеостате при микромолярных концентрациях субстрата, модель M2 была видоизменена до варианта модели, не учитывающей влияние мембранного потенциала на транспорт

периплазматических белков. Для этого в модели M2 значение параметра d_U было принято равным нулю, тем самым превращая транспорт белков через мембрану в нерегулируемый процесс. Данный вариант модели с постоянным транспортом мономеров NrfA и NrfB назовем M2*. Для адаптации новой модели M2* к экспериментальным данным требуется изменить значение параметра, описывающего транспорт, принятого для модели M2, а именно, увеличить значение константы скорости конститутивного транспорта белков NrfA и NrfB из цитоплазмы в периплазму по сравнению с исходным в 5.5 раз ($kt_{Nrf,cp} = 0.055 \text{ сек}^{-1}$). Полученные результаты приведены на рис. 22 (кривые 6–8). Согласно расчетам модели M2*, в которой концентрация Nrf редуктазы определяется исключительно уровнем транскрипции оперона *nrf*, итоговая активность фермента (рис. 22, кривая 6) при концентрации добавленного нитрита 1 мМ существенно ниже, чем рассчитанная активность редуктазы по модели M2 с дополнительной активацией транспорта субъединиц редуктазы мембранным потенциалом (рис. 22, кривая 1). Разница между активностями Nrf редуктазы по расчетам M2 и M2*моделей (рис. 22, кривая 7) представляет собой колоколообразную кривую, соответствующую той дополнительной активности, которая обеспечивает модели M2 адекватное описание экспериментальных данных по утилизации нитрита в хемостате (кривая 5), представленных на рис. 22 точками.

Таким образом, из анализа моделей M2 и M2* следует, что учет мембранного потенциала необходим для объяснения динамики утилизации нитрита при концентрациях субстрата меньше 1 мМ и этот результат не является артефактом простоты модели M1.

Внося небольшие изменения в модель M2 можно провести оценку влияния различных механизмов действия мембранного потенциала на активность периплазматической Nrf нитритредуктазы в утилизацию нитрита в микромолярной области концентраций субстрата. Известно, что мембранный потенциал играет значительную роль в формировании каталитически активной молекулы Nrf редуктазы как периплазматического фермента, влияя на ее секрецию в периплазму, стабильность и каталитические свойства [Daniels et al., 1981; Talmadge, Gilbert, 1982; van Wonderen et al., 2008; Price, Driessen, 2010]. Анализ гипотез о влиянии потенциала на стабильность периплазматических белков, их транспорт из

цитоплазмы и влияние на сродство фермента к субстрату был проведен на основе модели M2 аналогично анализу для модели M1 (см. параграф 2.2.9). Было подтверждено, что наиболее вероятным механизмом является изменение скорости секреции белков NrfA и NrfB из цитоплазмы в периплазму в зависимости от величины мембранного потенциала.

Что касается необходимости учета мембранного потенциала, то сравнительный анализ результатов M2 и M2* моделей, которые отличаются наличием или отсутствием влияния мембранного потенциала на транспорт белков в периплазму, приведенный в данном разделе, показал, что без учета влияния мембран-зависимого потенциала на скорость перераспределения белков NrfA и NrfB между цитоплазмой и периплазмой корректно описать экспериментальные данные по утилизации нитрита в хемостате [Wang et al., 1999] нельзя. Этот вывод, как показано выше, существенно опирается на данные по нитрит-зависимой генетической регуляции эффективности экспрессии *nrf* оперона (см. рис. 22).

Сходный характер кривых, отражающих зависимость эффективности экспрессии *nrf* оперона и влияния мембранного потенциала на скорость перераспределения белков NrfA и NrfB от концентрации добавленного нитрита (рис. 13, рис. 20) позволяет предположить, что для объяснения экспериментальных данных из работы [Wang et al., 1999] достаточно использовать только один из этих механизмов.

Поскольку невозможно провести адаптацию модели M2, опираясь исключительно на данные о генетической регуляции, то было предположено, что оперон *nrf* экспрессируется конститутивно. Для такого варианта модели M2 можно подобрать набор значений параметров (например: $m_{Nrf}(u) \equiv 1$, $m_{Nir}(u) \equiv 0$, $k_{s,NrfA} = k_{s,NrfB} = 0.0000045$ мМ/сек, $K_{nrf,1} = 0.11$ мМ, $h_{Nrf,1} = 2$, $\delta_{Nrf,2} = 0.0375$, $K_{nrf,2} = 0.6$ мМ, $h_{Nrf,2} = 8$, $\omega_2 = 0.005$, $K_{pmf,3} = 2.2$, $h_{pmf,3} = 15$, значения остальных параметров не менялись), при котором модель будет адекватно описывать динамику накопления нитрита в хемостате (результаты расчетов аналогичны результатам модели M2 рис. 21а).

Основываясь на результатах измененной модели M2, в которой активность периплазматической редуктазы определяется исключительно мембранным потенциалом, можно сделать вывод, что, данные по генетической регуляции эффективности экспрессии *nrf* оперона для объяснения кинетики накопления

нитрита в хемостате в зависимости от концентрации добавленного нитрита являются избыточными. Для объяснения кинетики утилизации нитрита вполне достаточно предположить конститутивную эффективность экспрессии *nrf* оперона и учесть влияние мембранного потенциала на перераспределение белков NrfA и NrfB между цитоплазмой и периплазмой.

Данный вывод носит теоретический характер, так как в исследуемых клетках *E. coli* обнаружена сильная нитрит-зависимая регуляция эффективности экспрессии *nrf* оперона [Wang, Gunsalus, 2000]. И тем не менее выявленная избыточность ставит важный теоретический вопрос об эволюционной целесообразности формирования столь сложного механизма регуляции экспрессии *nrf* оперона в клетках *E. coli*, поскольку для бактерии использование нитрита в качестве источника энергии возможно и в отсутствие сложной системы регуляции. Дальнейшее исследование функционирования клетки в условиях конститутивного синтеза периплазматической редуктазы возможно в ходе изучения кинетики утилизации нитрита клетками *E. coli*, содержащими повреждения в регуляторной области оперона *nrf*, и в ходе исследования физиологических характеристик данного штамма.

Таким образом, из результатов анализа модели M2 можно заключить, что, во-первых, экспериментально наблюдаемая активность периплазматической нитритредуктазы в области низких концентраций нитрита [Wang et al., 1999] является отражением сопряженного действия двух процессов: молекулярно-генетических механизмов регуляции синтеза субъединиц фермента нитритом на уровне транскрипции [Wang, Gunsalus, 2000] и механизмов регуляции секреции субъединиц фермента из цитоплазмы в периплазму под действием мембранного потенциала [Daniels et al., 1981], величина которого зависит от концентрации нитрита [Motteram et al., 1981; Pope, Cole, 1982]. Во-вторых, что внутриклеточная концентрация нитрита, токсичного для клетки, определяется соотношением скоростей его экспорта из клетки и утилизации цитоплазматической NirB редуктазой в клетке. Более того, проведенный анализ показал, что этот результат не является следствием упрощенного описания в модели M1 молекулярно-генетических и биохимических процессов, связанных с утилизацией нитрита в клетках *E. coli*.

В структуре модели M2 не учитываются механизмы формирования мембранного потенциала в условиях дыхания на нитрите. Процесс формирования потенциала в M2 описан феноменологической функцией из класса обобщенных функций Хилла [Likhoshvai, Ratushny, 2007] и адаптирован к экспериментальным данным [Motteram et al., 1981].

Для дальнейшего подтверждения выдвинутой гипотезы об участии мембранного потенциала в регуляции активности Nrf нитритредуктазы необходимо воспроизвести молекулярно-генетические механизмы его формирования в условиях дыхания на нитрите, которые пока до конца не ясны, и исследовать вклад мембранного потенциала в кинетику утилизации нитрита в хемостате. Теоретическому исследованию молекулярных механизмов формирования мембранного потенциала в условиях дыхания на нитрите посвящена глава 3.

Глава III. Реконструкция молекулярно-генетических механизмов формирования мембранного потенциала в условиях роста клеток *E. coli* на нитрите

Утилизация нитрита, согласно имеющимся на сегодняшний день экспериментальным данным, проходит либо по респираторному пути, в котором внеклеточный нитрит перерабатывается периплазматической Nrf редуктазой, либо субстрат проникает в клетку и утилизируется NirV редуктазой, а переключение между этими путями осуществляется за счет регуляции концентраций ферментов на уровне транскрипции. Однако в ходе анализа динамики функционирования модели системы утилизации нитрита была выявлена дополнительная нитрит-утилизирующая активность в условиях, обуславливающих работу периплазматической редуктазы, которая не может быть объяснена лишь генетической активацией фермента. Как показало исследование модели M1, наиболее вероятным фактором, позволяющим согласовать физиологические и генетические данные [Wang et al., 1999; Wang, Gunsalus, 2000] по кинетике утилизации нитрита в хеостате, является мембранный потенциал, и его роль состоит в регуляции активности периплазматической Nrf нитритредуктазы при концентрациях субстрата меньше 1 мМ. Для проверки этой гипотезы была разработана модель M2, в которой мембранный потенциал описывался обобщенной функцией Хилла, зависящей от концентрации нитрита в среде. Анализ этой модели показал, что механизм положительного влияния потенциала на транспорт периплазматических субъединиц совместно с известным механизмом активации нитритредуктазы на транскрипционном уровне позволяет описать экспериментально наблюдаемую активность периплазматической нитритредуктазы, а теоретически предсказанная область работы мембранного потенциала совпадает с экспериментально измеренной [Ри и др., 2015].

Представление мембранного потенциала в модели M2 в виде функции, зависящей от нитрита, по сути объединяет в себе описание совокупности процессов влияния нитрита на концентрацию ферментов, участвующих в цепи переноса электронов, и процессов каталитической активности этих ферментов по переносу

протонов через мембрану, но не раскрывает молекулярно-генетических механизмов его формирования. Подобное обобщенное описание процессов формирования мембранного потенциала является скорее основанием для дальнейшего исследования влияния потенциала на кинетику утилизации нитрита, нежели дает основание окончательно сделать выводы о вкладе данного механизма. Поэтому для подтверждения вклада мембранного потенциала в регуляцию активности периплазматической формат-зависимой Nrf нитритредуктазы необходимо было исследовать динамику модели с учетом конкретных процессов его формирования в условиях дыхания на нитрите.

Для этого необходимо было к уравнениям модели M2, описывающим процессы синтеза, комплексообразования и функционирования периплазматической редуктазы, добавить подмодели, описывающие те же процессы для ферментов, обеспечивающих цепь передачи электронов от формата к нитриту, с учетом молекулярно-генетических механизмов регуляции этих ферментов.

В процессе разработки подмодели формирования мембранного потенциала в условиях дыхания на нитрите выяснилось, что на сегодняшний день нет четких представлений о том как организована дыхательная цепь с форматом в качестве донора электронов и нитритом в качестве акцептора электронов.

В настоящее время известно, что в формировании мембранного потенциала в разной степени участвуют все три форматдегидрогеназы: Fdh-H, Fdh-N, Fdh-O и нитритредуктаза Nrf [Darwin et al., 1993; Wang, Gunsalus, 2003], однако какие из этих форматдегидрогеназ участвуют в формировании цепи переноса электронов в условиях дыхания на нитрите до сих не выявлено.

Для разработки модели необходимо было предложить последовательную схему окислительно-восстановительных процессов, ведущих к формированию мембранного потенциала в условиях дыхания на нитрите, которые бы не противоречили существующим экспериментальным данным и соответствовали условиям культивирования клеточной культуры *E. coli* в проточном хемостате [Wang, Gunsalus, 2000].

Для этого был проведен анализ известных и гипотетических механизмов формирования мембранного потенциала с участием каждой из трех форматдегидрогеназ и реконструирован возможный механизм его формирования с

учетом глюкозо-лимитированных условий стационарного роста клеток *E. coli* в проточном хемостате, который представлен ниже.

3.1. Форматдегидрогеназы в процессах дыхания на нитрите

У бактерии *E. coli* формат перерабатывается тремя форматдегидрогеназами: Fdh-H, Fdh-N, Fdh-O. Две из них – Fdh-N и Fdh-O – способны формировать разницу концентраций протонов по обе стороны мембраны за счет цепочки событий: окисления формата до углекислого газа, сопряженного с передачей двух образующихся электронов и двух протонов из цитоплазмы на молекулы менахинона или диметилменахинона, которые далее передаются на периплазматическую редуктазу. Описанный механизм реализуется в случае, если электроны принимает нитратредуктаза Nar [Cole, 1996], причем основной вклад в процесс дыхания осуществляет Fdh-N форматдегидрогеназа, поскольку Fdh-O нарабатывается в малых концентрациях [Abaibou et al., 1995]. В случае дыхания на нитрите ранее считалось, что Fdh-N и Fdh-O – единственные ферменты, способные участвовать в формировании дыхательной цепи [Abou-Jaoudé et al., 1979].

Экспериментальные данные по измерению кинетики восстановления нитрита клетками *E. coli*, содержащими делецию оперона *fdo*, кодирующего субъединицы Fdh-O дегидрогеназы, показали, что вклад Fdh-O дегидрогеназы в процесс дыхания не превышает 10% [Darwin et al., 1993], поэтому данный фермент далее не будет рассматриваться как основной участник формирования мембранного потенциала на нитрите. Изучение влияния делеций по генам, кодирующим Fdh-N и Fdh-H дегидрогеназы, показали, что в периодической культуре оба фермента примерно в равной степени обеспечивают поток электронов к Nrf редуктазе, определяя активность утилизации нитрита [Darwin et al., 1993]. Таким образом, активности форматдегидрогеназ для нитратного и нитритного дыхания существенно отличаются. Позднее Вангом и коллегами [Wang, Gunsalus, 2003] был проведен анализ экспрессии оперонов, кодирующих упомянутые дегидрогеназы в глюкозо-лимитированных условиях стационарного роста на нитрите. Было показано, что в условиях хемостата в области низких концентраций нитрита Fdh-N дегидрогеназа практически не синтезируется, и достаточно высокой активностью обладает только Fdh-H форматдегидрогеназа, которая считается основным ферментом переработки

формата в условиях ферментации, т.е. в отсутствие электронных акцепторов, таких как нитрит [Cole, 1996]. Повышенный уровень экспрессии Fdh-H по сравнению с остальными форматдегидрогеназами и характер транскрипционной активности, аналогичный Nrf редуктазе, позволили Вангу и коллегам предположить [Wang, Gunsalus, 2003], что именно эта форматдегидрогеназа может обеспечивать респираторные процессы в условиях хемостата, однако механизм ее участия к настоящему моменту не был экспериментально изучен.

Несмотря на явные свидетельства участия Fdh-H дегидрогеназы в передаче электронов к нитриту, отсутствие свидетельств о возможности Fdh-H связываться с хинонами подвергает сомнению возможность ее прямого участия в создании цепи передачи электронов. До настоящего времени не было предложено структуры цепи передачи электронов от формата к нитриту с участием Fdh-H форматдегидрогеназы, и для создания модели, в которой мембранный потенциал является не обобщенной функцией, а следствием работы мембранных ферментов по перекачке протонов из цитоплазмы в периплазму, необходимо было предложить наиболее вероятный из гипотетических сценариев формирования мембранного потенциала.

3.2. Сценарии формирования мембранного потенциала на нитрите

Fdh-H форматдегидрогеназа входит в состав двух мультиферментных цитоплазматически ориентированных комплексов FHL-1 и FHL-2, ассоциированных с мембраной. Форматгидрогенлиазный комплекс FHL-1 помимо Fdh-H дегидрогеназы содержит гидрогеназу Hyd-3, а FHL-2 – гидрогеназу Hyd-4 [Andrews et al., 1997; McDowall et al., 2014]. Рассмотрим возможности обоих комплексов с точки зрения их участия в формировании дыхательной цепи в условиях культивирования клеток в проточном хемостате на нитрите.

3.2.1. Сценарий формирования мембранного потенциала с участием форматлиазного комплекса FHL-1

В результате сопряженной активности ферментов FHL-1 комплекса из формата в цитоплазме синтезируется молекулярный водород (H_2), который в отсутствие электронных акцепторов выводится из клетки и накапливается в среде. В респираторных условиях, в присутствии электронных акцепторов, этот водород

может быть использован в качестве субстрата респираторными мембран-связанными гидрогеназами, которых у *E. coli* как минимум две – гидрогеназа Hyd-1 и Hyd-2 [Pinske, Sargent, 2016]. Это предположение не вступает в противоречие с каталитическими свойствами ферментов. Известно, что константы Михаэлиса для Hyd-1 и Hyd-2 по отношению к водороду имеют на порядок более низкие значения (2–4 мкМ), чем Hyd-3 (34 мкМ) [Ballantine, Boxer, 1986; Francis et al., 1990; McDowall et al., 2014], что создает реальную возможность утилизации H_2 в периплазме при появлении в среде акцепторов электронов, в частности, нитрита. Учитывая данные [Noguchi et al., 2010; Lukey et al., 2010], согласно которым в анаэробных условиях *in vivo* Hyd-1 гидрогеназа не участвует в потреблении H_2 , можно предположить, что в утилизации водорода участвует другая гидрогеназа – Hyd-2. Показано также, что опероны, кодирующие Hyd-3 и Hyd-2, экспрессируются в области пониженных значений pH при ограничении уровня глюкозы в среде [Rossmann et al., 1991; Noguchi et al., 2010], что соответствует условиям (pH=6.5 и концентрации глюкозы 2.25 мМ) проведения эксперимента Ванга и коллег в хемостате [Wang, Gunsalus, 2000]. Это позволяет рассматривать пару FHL-1 и Hyd-2 как возможных участников цепи передачи электронов от формата к нитриту в условиях хемостата.

На основании имеющихся экспериментальных данных о кинетических характеристиках форматдегидрогеназы Fdh-H и гидрогеназ Hyd-3 и Hyd-2 был предложен сценарий формирования гипотетической цепи передачи электронов в глюкозо-лимитирующих условиях анаэробного дыхания на нитрите с участием FHL-1 комплекса и Hyd-2 гидрогеназы (рис. 24). Окисление формата форматгидрогенлиазным комплексом FHL-1 приводит к синтезу молекулярного водорода (H_2), который диффундирует в периплазму и в присутствии нитрита служит субстратом для респираторной гидрогеназы Hyd-2 и источником электронов для Nrf редуктазы, восстанавливающей благодаря этому нитрит до аммония.

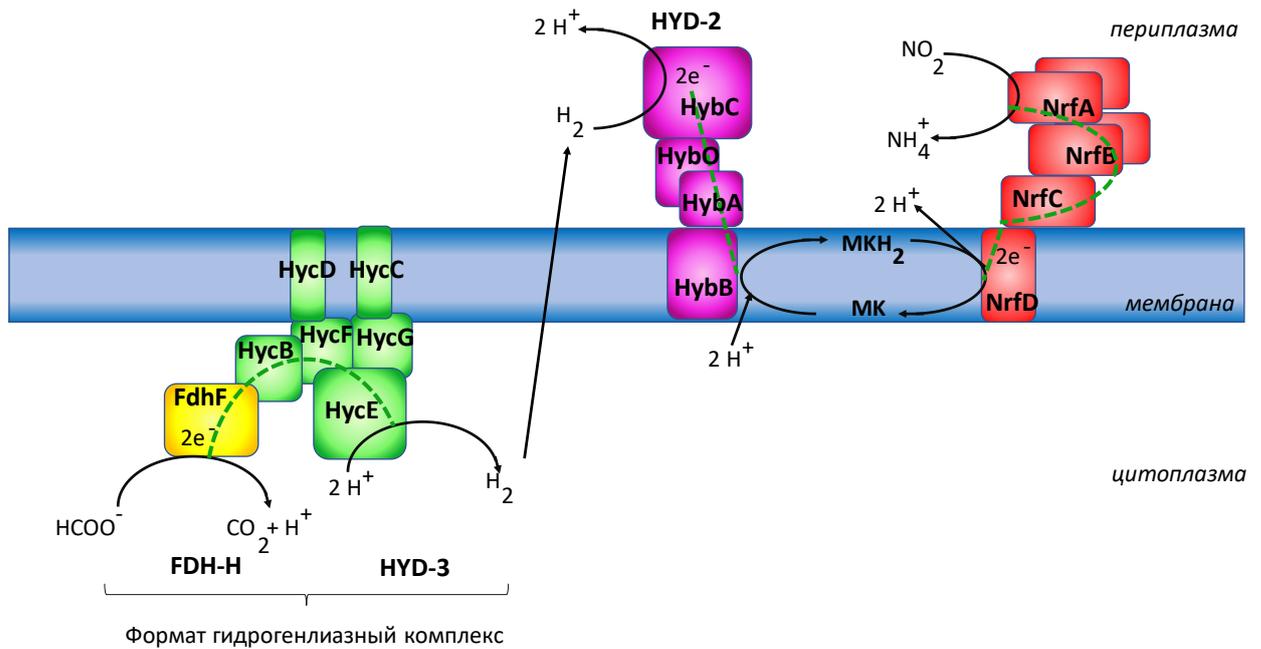


Рис. 24. Схема гипотетической цепи передачи электронов с участием FHL-1 комплекса в условиях дыхания на нитрите с использованием в качестве посредника респираторной, мембран-связанной Hyd-2 гидрогеназы.

Известно, что сценарий цепи передачи электронов, аналогичный представленному на рис. 24, с участием мембранных гидрогеназ реализуется в условиях анаэробного дыхания на фумарате [Pinske et al., 2014]. В качестве принимающих акцепторов для дегидрогеназы помимо фумарата могут выступать также и ТМАО и ДМСО метаболиты, но не нитрат, поскольку последний ингибирует экспрессию дегидрогеназы. Возможно ли формирование цепи переноса электронов, в которой донором является водород, а нитрит – акцептором остается открытым, поскольку единственный эксперимент [Laurinavichene, Tsygankov, 2001], результаты которого не поддерживают сценарий, предложенный на рис. 24, и опровергают участие Hyd-2 в потреблении водорода в присутствии нитрита, проводился в области высоких значений нитрита, равных 10 мМ, что гораздо выше области значений, оптимальных для респираторной нитритредуктазы, судя по низкому значению константы Михаэлиса для нитрита [Clarke et al., 2008].

В отсутствие других работ, которые бы исследовали кинетику утилизации водорода гидрогеназами в условиях, близких к оптимальным для Nrf редуктазы, а также в различных областях pH среды, можно считать, что гипотеза об участии FHL-1 и Hyd-2 в формировании цепи передачи электронов в условиях дыхания на нитрите имеет право на существование.

Альтернативным вариантом участия FHL-1 ферментного комплекса в формировании протонного градиента может быть участие Hyd-3 гидрогеназы, входящей в его состав в качестве протонной помпы.

Эта возможность просматривается в структуре HucD/HucC субъединиц Hyd-3 фермента, обладающих значительным сходством с респираторным комплексом НАДН-хиноноксидоредуктазы (Complex 1) [Efremov, Sazanov, 2012; McDowall et al., 2014; Pinske, Sargent, 2016; Sargent, 2016], и продемонстрирована в экспериментах у двойных мутантов с делециями оперонов *huc* [Hyd-1] и *hyb* [Накобыан et al., 2005], проведенных при pH 6.5 в ферментирующих условиях, что совпадает с условиями роста клеток в проточном хеостате [Tseng et al., 1994] в отсутствие нитрита. В то же время для реализации данной гипотезы необходимо наличие у Hyd-3 гидрогеназы каталитических сайтов связывания с мена- или диметилменахиноном для обеспечения потока электронов к периплазматической нитритредуктазе. К настоящему моменту функциональных сайтов связывания с хинонами не найдено. Тем не менее для гидрогеназы Hyd-3 была показана возможность восстановления искусственного восстановителя – бензилвиологена в ходе обратной реакции превращения молекулярного водорода в протоны [Pinske et al., 2012]. В этом случае соответствующий альтернативный механизм формирования протон-транслоцирующего канала у форматлиазного комплекса FHL-1 и перенос электронов и протонов на хиноны, будет идентичен модели и механизму функционирования FHL-2 форматлиазного комплекса, который будет рассмотрен далее.

3.2.2. Сценарий формирования мембранного потенциала с участием форматлиазного комплекса FHL-2

Помимо FHL-1 ферментного комплекса у бактерии *E. coli* был обнаружен ферментный комплекс FHL-2 со сходными функциями, в состав которого вместо Hyd-3 гидрогеназы входит гидрогеназа Hyd-4. Изучение FHL-2 комплекса началось относительно недавно по сравнению с остальными ферментами нитрат-нитритного метаболического пути, в связи с чем физиологическая роль FHL-2 комплекса до сих пор не ясна [Sargent, 2016].

Согласно данным по особенностям экспрессии Hyd-4 гидрогеназы, комплекс FHL-2 нарабатывается и окисляет формат в условиях слегка повышенных значений

pH [Bagramyan et al., 2002; Mnatsakanyan et al., 2004]. Впрочем, существуют и противоположные данные о том, что Hyd-4 нарабатывается при пониженном значении pH [Skibinski et al., 2002], как и в экспериментах Ванга в хемостате [Wang, Gunsalus, 2000], а наличие у Hyd-4 фермента субъединиц с предсказанной протон-транслоцирующей функцией [Andrews et al., 1997; Skibinski et al., 2002; Efremov, Sazanov, 2012] позволяет предположить возможность ее участия в процессах дыхания на нитрите.

На основании данных о возможном участии Hyd-4 в составе альтернативного форматгидрогеназного комплекса в цепи переноса электронов был предложен следующий альтернативный сценарий формирования гипотетической цепи передачи электронов с участием FHL-2 комплекса в глюкозо-лимитирующих условиях анаэробного дыхания на нитрите, представленный на рис. 25.

Таким образом, сформировано два альтернативных гипотетических сценария формирования цепи передачи электронов с участием FHL-1 и FHL-2 форматгидрогеназных комплексов в условиях анаэробного дыхания на нитрите и культивирования клеток в проточном хемостате. Сценарии носят гипотетический характер, потому что имеющихся экспериментальных данных недостаточно для полной реконструкции дыхательной цепи на нитрите.

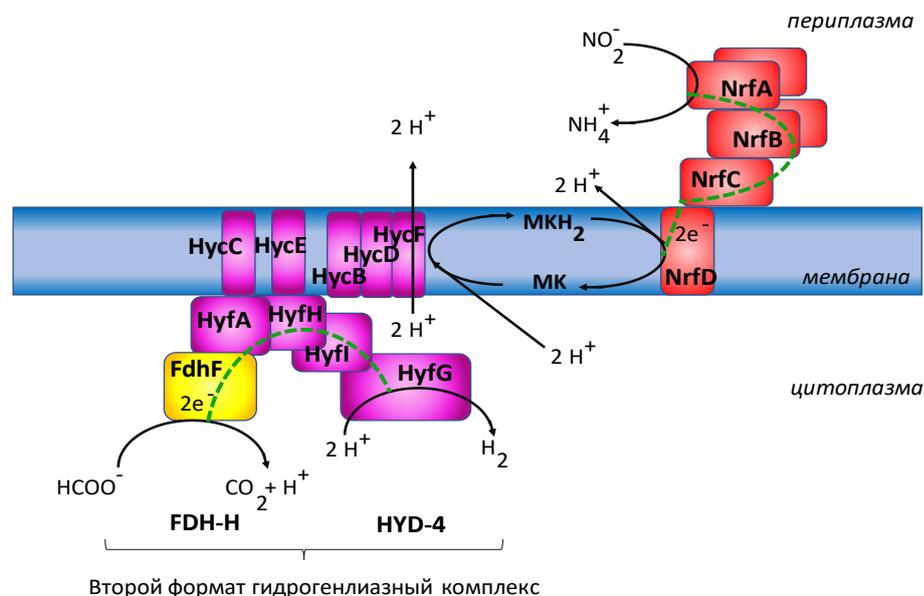


Рис. 25. Схема гипотетической цепи передачи электронов с участием FHL-2 комплекса в условиях дыхания на нитрите.

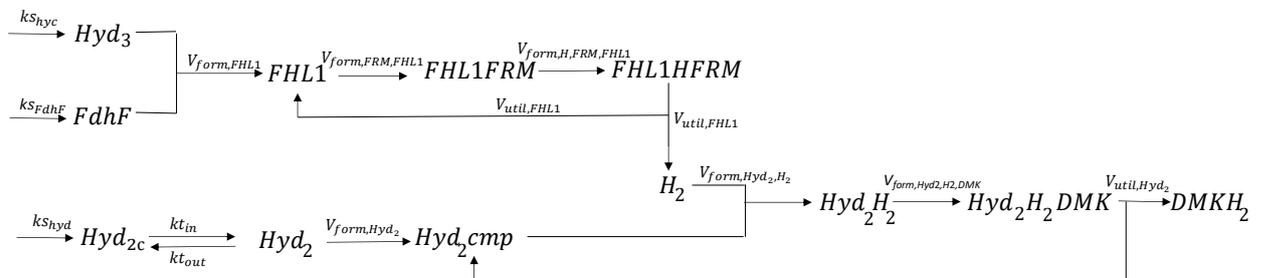
3.3 Математическая модель формирования мембранного потенциала

Для доказательства участия мембранного потенциала в регуляции активности респираторной Nrf редуктазы была создана математическая модель на базе разработанной ранее модели M2, описывающей молекулярно-генетические механизмы утилизации нитрита клетками *E. coli* в глюкозо-лимитирующих условиях проточного хемостата. Модель M2 была дополнена подсистемами, описывающими молекулярно-генетические и метаболические процессы формирования протонного градиента в условиях дыхания на нитрите согласно упомянутым ранее сценариям, с участием FHL-1 FHL-2 форматлиазных комплексов (рис. 24, рис. 25).

На первой стадии формат утилизируется FHL-1/2 комплексом, и нарабатываемые протоны используются согласно сценарию 1 или 2 в процессе окисления-восстановления хинонов (менахинона $MK \leftrightarrow MKH_2$ или диметилменахинона $DMK \leftrightarrow DMKH_2$), которое происходит в ходе окисления формата и восстановления нитрита Nrf редуктазой. В итоге мембранный потенциал в детализированной и дополненной модели представляет собой соотношение концентраций протонов в периплазме к цитоплазматической концентрации, т.е. равен химической составляющей процесса переноса протонов.

3.3.1. Математическая модель (M3) формирования мембранного потенциала с участием FHL-1 комплекса

Сценарий 1 (см. рис. 24) описывает гипотетический молекулярно-генетический механизм формирования протонного градиента на мембране клетки *E. coli* в результате процессов, последовательность которых показана на схеме ниже.



Модель M3, построенная согласно схеме сценария 1, включает в себя молекулярно-генетические механизмы функционирования ферментных комплексов FHL-1 и Hyd-2, обеспечивающих процессы утилизации формата и молекулярного

водорода, а также процессы синтеза субъединиц этих ферментов, сборки активных комплексов: FHL-1 в цитоплазме и Hyd-2 гидрогеназы в периплазме. Формат (FRM_c), который окисляется FHL-1 комплексом, синтезируется из пирувата, который, в свою очередь, нарабатывается из продуктов превращения глюкозы благодаря активности пируватформатлиазного комплекса PFL [Sawers et al., 2005]. Процесс синтеза формата в модели описан функцией, зависящей от концентрации нитрита, поскольку Кайзером и коллегами [Kaiser et al., 1995] было показано, что экспрессия *pfl* оперона, кодирующего структуру субъединиц пируватформатлиазного комплекса PFL, контролируется через NarL транскрипционный фактор, активирующийся в присутствии нитрита в среде.

$$k_{S_{FRM}}(u) = k_{S_{FRM,0}} \cdot \frac{1 + w_{i_{NO_2,FRM}} \cdot \left(\frac{u}{K_{u,FRM}}\right)^{h_{u,FRM}}}{1 + \left(\frac{u}{K_{u,FRM}}\right)^{h_{u,FRM}}}, \quad (3.1)$$

Здесь $k_{S_{FRM,0}}$ – базовая константа синтеза формата; $w_{i_{NO_2,FRM}}$, $K_{u,FRM}$, $h_{u,FRM}$ – константы, входящие в обобщенную функцию Хилла, описывающие ингибирующий эффект нитрита на скорость синтеза формата.

Концентрация формата в цитоплазме клетки, которая зависит от соотношения скоростей его синтеза, окисления ферментами FHL-1 комплекса до углекислого газа и водорода, а также вывода из клетки благодаря активности FocA транспортера [Sawers, 1994], определяется согласно уравнению:

$$\frac{dFRM_c}{dt} = k_{S_{FRM}}(u) \cdot FRM_c - k_{flow} \cdot FRM_c - V_{form,FRM,FHL1} \quad (3.2)$$

Здесь $V_{form,FRM,FHL1}$ – скорость утилизации формата, $k_{S_{FRM}}(u)$ – скорость синтеза формата, зависящая от уровня нитрита в среде, k_{flow} – константа скорости оттока FRM_c из цитоплазмы в периплазму.

Процессы формирования активного FHL-1 комплекса в модели описаны системой уравнений:

$$\left\{ \begin{array}{l}
\frac{dFdhF_c}{dt} = ks_{FdhF} \cdot m_{FdhF} - V_{form,FHL1} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FdhF_c, \\
\frac{dHyd_{3,c}}{dt} = ks_{hyc} \cdot m_{hyc} - V_{form,FHL1} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot Hyd_{3,c}, \\
\frac{dFHL1_c}{dt} = V_{form,FHL1} - V_{form,FRM,FHL1} + V_{util,FHL1} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL1_c, \\
\frac{dFHL1FRM_c}{dt} = V_{form,FRM,FHL1} - V_{form,H,FRM,FHL1} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL1FRM_c, \\
\frac{dFHL1HFRM_c}{dt} = V_{form,H,FRM,FHL1} - V_{util,FHL1} - k_{flow} \cdot FHL1HFRM_c;
\end{array} \right.$$

(3.3)

где $FdhF_c$ и $Hyd_{3,c}$ – концентрации мономеров форматдегидрогеназы Fdh-H и субъединиц HYD-3 гидрогеназы в цитоплазме, значения которых определяются соответствующими константами синтеза ks_{Fdh} и ks_{hyc} , и значениями относительных активностей оперонов m_{FdhF} и m_{hyc} ; $k_{d,c}$ – константы деградации белков и комплексов в цитоплазме. $FHL1_c$, $FHL1FRM_c$, $FHL1HFRM_c$ – концентрации комплексов FHL-1 и его соединений с форматом и протоном, соответственно.

Синтез субъединиц ферментного комплекса FHL-1 определяется уровнем экспрессии оперонов $fdhF$ и hyc , кодирующих их структуру, и описан функциями m_{fdhF} и m_{hyc} соответственно. Их вид определен на основании данных [Hopper et al., 1994, Richard et al., 1999; Wang, Gunsalus, 2003], которые свидетельствуют о том, что эти опероны подвержены отрицательной регуляции нитратом. Поскольку для нитрата и нитрита существует единая система регуляции через NarP и NarL транскрипционные факторы, то можно предположить появление ингибирующего действия на экспрессию оперонов и со стороны нитрита. В модели активность оперонов $fdhF$ и hyc описана формулами:

$$m_{fdhF} = \frac{\delta_{fdhF,0} + \delta_{fdhF,1} \cdot \left(\frac{u}{K_{fdhF,1}}\right)^{h_{fdhF,1}} + \delta_{fdhF,2} \cdot \left(\frac{u}{K_{fdhF,1}}\right)^{h_{fdhF,2}}}{1 + \left(\frac{u}{K_{fdhF,1}}\right)^{h_{fdhF,1}} + \left(\frac{u}{K_{fdhF,1}}\right)^{h_{fdhF,2}}} \quad (3.4)$$

$$m_{hyc} = \frac{\delta_{hyc,0} + \delta_{hyc,1} \cdot \left(\frac{u}{K_{hyc,1}}\right)^{h_{hyc,1}} + \delta_{hyc,2} \cdot \left(\frac{u}{K_{hyc,1}}\right)^{h_{hyc,2}}}{1 + \left(\frac{u}{K_{hyc,1}}\right)^{h_{hyc,1}} + \left(\frac{u}{K_{hyc,1}}\right)^{h_{hyc,2}}} \quad (3.5)$$

FHL-1 форматлиазный комплекс формируется из мономера $FdhF$, синтезируемого с оперона $fdhF$ и четырех субъединиц: $HydB$, $HydF$, $HydG$ и $HydE$ [McDowall et al., 2014], нарабатываемых с оперона huc в равных количествах согласно предположению, принятому в модели:

$$V_{form,FHL1} = k_{FHL1} \cdot \left(\frac{FdhF_c \cdot Hyd_{3,c}^4}{K_{dis,FHL1}^4} - FHL1_c \right) \quad (3.6)$$

Комплекс FHL-1 связывается с форматом со скоростью $V_{form,FRM,FHL1}$ и далее с цитоплазматическим пулом протонов – со скоростью $V_{form,H,FRM,FHL1}$:

$$V_{form,FRM,FHL1} = k_{FRM,FHL1} \cdot \left(\frac{FHL1_c \cdot FRM_c}{K_{dis,FRM,FHL1}} - FRMFHL1_c \right) \quad (3.7)$$

$$V_{form,H,FRM,FHL1} = k_{H,FRM,FHL1} \cdot \left(\frac{FRMFHL1_c \cdot H_{in}}{K_{dis,H,FRM,FHL1}} - FRMHFHL1_c \right) \quad (3.8)$$

$$V_{util,FHL1} = kcat_{FHL1} \cdot FHL1HFRM_c \quad (3.9)$$

Процессы синтеза субъединиц Hyd_2 гидрогеназы и формирования активной формы фермента в периплазматическом пространстве клетки описаны системой уравнений (3.10).

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d}{dt} Hyd_{2,c} = ks_{hyd} \cdot m_{hyd} - (kt_{out}(PMF) \cdot Hyd_{2,c} - kt_{in} \cdot Hyd_2) - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot Hyd_{2,c}, \\ \frac{d}{dt} Hyd_2 = -k_{peripl} \cdot (kt_{out}(PMF) \cdot Hyd_{2,c} - kt_{in} \cdot Hyd_2) - V_{form,Hyd_2} - (k_{d,prp} + k_{flow}) \cdot Hyd_2, \\ \frac{d}{dt} Hyd_{2,cmp} = V_{form,Hyd_2} - V_{form,Hyd_2,H_2} + V_{util,Hyd_2} - (k_{d,prp} + k_{flow}) \cdot Hyd_{2,cmp}, \\ \frac{d}{dt} Hyd_2H_2 = V_{form,Hyd_2,H_2} - V_{form,Hyd_2,H_2,DMK} - (k_{d,prp} + k_{flow}) \cdot Hyd_2H_2, \\ \frac{d}{dt} Hyd_2H_2DMK = V_{form,Hyd_2,H_2,DMK} - V_{form,Hyd_2,H_2,DMK,H} - (k_{d,prp} + k_{flow}) \cdot Hyd_2H_2DMK, \\ \frac{d}{dt} Hyd_2H_2DMKH = V_{form,Hyd_2,H_2,DMK,H} - V_{form,Hyd_2,H_2,DMK,H_2} - (k_{d,prp} + k_{flow}) \cdot Hyd_2H_2DMKH, \\ \frac{d}{dt} Hyd_2H_2DMKH_2 = V_{form,Hyd_2,H_2,DMK,H_2} - V_{util,Hyd_2} - k_{flow} \cdot Hyd_2H_2DMKH_2. \end{array} \right. \quad (3.10)$$

Здесь $Hyd_{2,c}$ – концентрация субъединиц Hyd-2 в цитоплазме, Hyd_2 , $Hyd_{2,cmp}$, Hyd_2H_2 , Hyd_2H_2DMK , Hyd_2H_2DMKH , $Hyd_2H_2DMKH_2$ – концентрации субъединиц фермента, активных комплексов Hyd-2 и ее соединений с молекулярным водородом в периплазме, диметилхиноном и протонами, соответственно; ks_{hyd} – константа синтеза мономеров с оперона hyd . $kt_{out}(PMF)$ – константа транспорта субъединиц гидрогеназы Hyd-2 в периплазматическое пространство; kt_{in} – константа обратного транспорта субъединиц в цитоплазму; $k_{d,c}$ и $k_{d,prp}$ – константы деградации белков и комплексов в цитоплазме и периплазме соответственно.

По аналогии с регуляцией экспрессии huc оперона, кодирующего Hyd-3 гидрогеназу, в модели транскрипция оперона hyb , кодирующего Hyd-2, находится под ингибирующим контролем не только нитрата, что подтверждено экспериментально [Richard et al., 1999], но и нитрита. Данный факт нашел отражение в функции, описывающей относительную активность оперона hyd :

$$m_{hyd} = \frac{s0_{hyd} + s1_{hyd} \cdot \left(\frac{u}{K1_{hyd}} \right)^{h1_{hyd}}}{1 + \left(\frac{u}{K1_{hyd}} \right)^{h1_{hyd}}} \quad (3.11)$$

Скорости формирования комплекса V_{form,Hyd_2} , связывание гидрогеназы с водородом V_{form,Hyd_2,H_2} и хиноном $V_{form,Hyd_2,H_2,DMK}$ выражаются уравнениями:

$$V_{form,Hyd_2} = k_{Hyd_2} \cdot \left(\frac{Hyd_2^3}{K_{dis,Hyd_2}} - Hyd_{2,cmp} \right), \quad (3.12)$$

$$V_{form,Hyd_2,H_2} = k_{Hyd_2,H_2} \cdot \left(\frac{Hyd_{2,cmp} \cdot H_2}{K_{dis,Hyd_2,H_2}} - Hyd_2H_2 \right), \quad (3.13)$$

$$V_{form,Hyd_2,H_2,DMK} = k_{Hyd_2,H_2,DMK} \cdot \left(\frac{Hyd_{2,cmp} H_2 \cdot DMK}{K_{dis,Hyd_2,H_2,DMK}} - Hyd_2H_2DMK \right) \quad (3.14)$$

$$V_{form,Hyd_2,H_2,DMK,H} = k_{Hyd_2,H_2,DMK,H} \cdot \left(\frac{Hyd_2H_2DMK_2 \cdot H_{in}}{K_{dis,Hyd_2,H_2,DMK,H}} - Hyd_2H_2DMKH \right) \quad (3.15)$$

$$V_{form,Hyd_2,H_2,DMK,H_2} = k_{Hyd_2,H_2,DMK,H_2} \cdot \left(\frac{Hyd_2H_2DMK_2H \cdot H_{in}}{K_{dis,Hyd_2,H_2,DMK,H_2}} - Hyd_2H_2DMKH_2 \right) \quad (3.16)$$

$$V_{util,Hyd_2} = kcat_{Hyd_2} \cdot Hyd_2H_2DMKH_2 \quad (3.17)$$

где k_{Hyd_2} , k_{Hyd_2,H_2} , $k_{Hyd_2,H_2,DMK}$, $k_{Hyd_2,H_2,DMK,H}$, k_{Hyd_2,H_2,DMK,H_2} – константы распада комплексов гидрогеназы Hyd-2 и ее соединений с субстратами – молекулярным водородом,

диметилхиноном и протонами; K_{dis,Hyd_2} , K_{dis,Hyd_2,H_2} , $K_{dis,Hyd_2,H_2,DMK}$, $K_{dis,Hyd_2,H_2,DMK,H}$ – константы диссоциации вышеуказанных комплексов; $kcat_{Hyd_2}$ – константа оборота фермента Hyd-2.

Процессы секреции субъединиц Hyd-2 из цитоплазмы в периплазму осуществляются через Tat систему транспорта, которая зависит от величины мембранного потенциала [Hatzixanthis 2003]. В модели скорость транспорта субъединиц гидрогеназы зависит от величины потенциала – переменной PMF согласно степенной функции Хилла [Likhoshvai, Ratushny, 2007]

$$kt_{out}(PMF) = \frac{kt_0 + w_{kt} \cdot \left(\frac{PMF}{K_{t,PMF}}\right)^{h_{kt,PMF}}}{1 + \left(\frac{PMF}{K_{t,PMF}}\right)^{h_{kt,PMF}}} \quad (3.17)$$

Значение мембранного потенциала определяется соотношением концентрации протонов по обе стороны мембраны

$$PMF = \frac{k_{H_{out}}}{H_{in}} \quad (3.18)$$

Концентрация протонов в цитоплазме H_{in} определяется согласно уравнению:

$$\frac{d}{dt} H_{in} = ks_{H_{in}} - k_{flow} \cdot H_{in} + V_{atp} - V_{form,Hyd_2,H_2,DMK,H} - V_{form,Hyd_2,H_2,DMK,H_2} \quad (3.19)$$

Здесь $ks_{H_{in}}$ – суммарная скорость наработки протонов в цитоплазме, V_{atp} – скорость работы F₀F₁ АТФ-синтазы, которая осуществляет транспорт протонов из периплазмы (kH_{out}) в цитоплазму. Скорость АТФ-синтазы в модели определяется согласно формуле:

$$V_{atp} = k_{atp}(PMF) \cdot \frac{kcat_{ATPase} \cdot k_{H_{out}} \cdot ATPase}{K_{M,ATPase} + k_{H_{out}}} \quad (3.20)$$

здесь kH_{out} – концентрация протонов в периплазме, $ATPase$ – концентрация АТФ-синтазы в клетке, которая, исходя из данных [Kasimoglu et al., 1996], в модели принята постоянной; $kcat_{ATPase}$, $K_{M,ATPase}$ – константа оборота АТФазы и константа Михаэлиса для протонов соответственно.

Скорость переноса протонов из периплазмы в цитоплазму определяется величиной мембранного потенциала согласно механизму работы фермента АТФ-синтазы [Wiedenmann et al., 2008] и описана с использованием функции Хилла:

$$k_{atp}(PMF) = \frac{k_{atp,0} + w_{atp} \cdot \left(\frac{PMF}{K_{atp,PMF}}\right)^{h_{atp,PMF}}}{1 + \left(\frac{PMF}{K_{atp,PMF}}\right)^{h_{atp,PMF}}} \quad (3.21)$$

Молекулярный водород (H_2), нарабатываемый в ходе окисления формата FHL-1 комплексом ($V_{FHL1,util}$), как и все газы, беспрепятственно диффундирует в периплазматическое пространство клетки и перерабатывается гидрогеназой Hyd-2 (V_{form,Hyd_2,H_2}), избыток выводится далее из клетки ($k_{H_2,out} \cdot H_2$). Этот процесс описан следующим уравнением:

$$\frac{d}{dt} H_2 = k_{peripl} \cdot V_{util,FHL1} - V_{form,Hyd_2,H_2} - (k_{flow} + k_{H_2,out}) \cdot H_2. \quad (3.22)$$

Связь между двумя системами утилизации формата и нитрита осуществляется через пул хинонов. В анаэробных условиях наибольшую роль играют диметилменахинол ($DMKH_2$) и менахинол (MKH_2), концентрации которых зависят от присутствия того или иного акцептора в среде. Поскольку при культивировании *E. coli* в присутствии нитрита концентрация $DMKH_2$ в клетке в два раза больше, чем MKH_2 (оценено из данных [Bremer et al., 2008; Uden et al., 1997; Outten et al., 2001]), модель адаптирована к концентрациям $DMKH_2$, что не исключает возможного участия и MKH_2 в процессе переноса электронов.

Концентрация диметилменахинона (DMK) и его восстановленной формы диметилменахинола ($DMKH_2$) в мембране, а также концентрации активной формы Nrf редуктазы и ее комплексов с нитритом, $DMKH_2$ и протоном определяются согласно уравнениям:

$$\left\{ \begin{array}{l}
\frac{d}{dt} DMK = -V_{form,Hyd_2,H_2,DMK} + 3 \cdot V_{util,Nrf} - k_{flow} \cdot DMK, \\
\frac{d}{dt} DMKH_2 = k_{S_{DMKH_2}} - V_{util,Hyd_2} + 3 \cdot V_{form,DMK,H,NO_2,Nrf} - k_{flow} \cdot DMKH_2, \\
\frac{d}{dt} NrfA_2B_2 = V_{form,Nrf} + V_{util,Nrf} - V_{form,u,Nrf} - (k_{d,ppp} + k_{flow}) \cdot NrfA_2B_2, \\
\frac{d}{dt} Nrfu = V_{form,u,Nrf} - V_{form,H,u,Nrf} - (k_{d,ppp} + k_{flow}) \cdot Nrfu, \\
\frac{dNrfHu}{dt} = V_{form,H,u,Nrf} - V_{form,DMK,H,u,Nrf} - (k_{d,ppp} + k_{flow}) \cdot NrfHu, \\
\frac{dNrfDMKHu}{dt} = V_{form,DMK,H,u,Nrf} - V_{util,Nrf} - k_{flow} \cdot NrfDMKHu.
\end{array} \right. \quad (3.23)$$

Здесь $k_{S_{DMKH_2}}$ – константа синтеза хинола, $V_{form,Hyd_2,H_2,DMK}$ – скорость формирования комплекса гидрогеназы и субстратов, V_{util,Hyd_2} – скорость высвобождения продуктов гидрогеназой. Уравнения, определяющие концентрации мономеров NrfA и NrfB и димеров NrfAB, описаны аналогично модели M2. $V_{form,Nrf}$ – скорость формирования активной формы Nrf фермента из димеров NrfAB, $V_{form,u,Nrf}$, $V_{form,H,u,Nrf}$, $V_{form,DMK,H,u,Nrf}$ – скорость связывания Nrf с нитритом, периплазматическими протонами и хинолами; $V_{Nrf,util}$ – скорость высвобождения продуктов Nrf редуктазой соответственно. Скорости, связанные с работой нитритредуктазы записываются уравнениями:

$$V_{form,u,Nrf} = k_{Nrf,u} \cdot \left(\frac{NrfA_2B_2 \cdot u}{K_{M,Nrf}} - Nrfu \right), \quad (3.24)$$

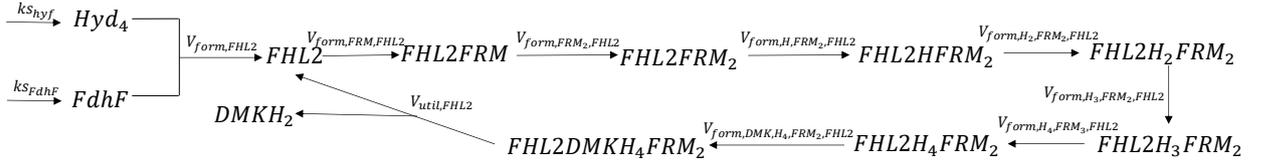
$$V_{form,H,u,Nrf} = k_{Nrf,H,u,Nrf} \cdot \left(\frac{Nrfu \cdot k_{H_{out}}^2}{K_{dis,H,u,Nrf}^2} - NrfHu \right), \quad (3.25)$$

$$V_{form,DMK,H,u,Nrf} = k_{Nrf,DMKH_2,H,u,Nrf} \cdot \left(\frac{NrfHu \cdot DMKH_2^3}{K_{dis,DMKH_2,H,u,Nrf}^3} - NrfDMKHu \right), \quad (3.26)$$

$$V_{Nrf,util} = k_{cat,Nrf} \cdot NrfDMKHu. \quad (3.27)$$

3.3.2. Математическая модель (M4) формирования мембранного потенциала с участием FHL-2 комплекса

Сценарий 2 (см. рис. 25) описывает гипотетический молекулярно-генетический механизм формирования протонного градиента на мембране клетки *E. coli* с участием FHL-2 комплекса. Процессы, приводящие к переносу протонов через мембрану, показаны на схеме ниже.



Отличие данного сценария от предыдущего варианта формирования мембранного потенциала связано с различиями в механизмах функционирования FHL-1 и FHL-2 форматдегидрогеназных комплексов. В модели М4, построенной согласно сценарию 2, мембранный потенциал генерируется напрямую за счет переноса протонов с помощью FHL-2 комплекса, который за один ферментативный акт переносит два протона в периплазму и два протона на хиноны, тем самым из цитоплазмы выводятся четыре протона, что описывается уравнением:

$$\frac{dH_{in}}{dt} = k_{S_{H_{in}}} - k_{flow} \cdot H_{in} + V_{atp} - V_{form,H,FRM_2,FHL2} - V_{form,H_2,FRM_2,FHL2} - V_{form,H_3,FRM_2,FHL2} - V_{form,H_4,FRM_2,FHL2} \quad (3.28)$$

Здесь $k_{S_{H_{in}}}$ – обобщенная скорость наработки внутриклеточных протонов; $V_{form,H,FRM_2,FHL2}$, $V_{form,H_2,FRM_2,FHL2}$, $V_{form,H_3,FRM_2,FHL2}$, $V_{form,H_4,FRM_2,FHL2}$ описывают скорости формирования комплекса протонов и FHL-2.

Синтез донора электронов – формата ($k_{S_{FRM}}(u)$), как и в предыдущем (3.1) сценарии, зависит от уровня нитрита, однако скорость утилизации формата FHL-2 отличается от скорости FHL-1 комплекса в силу различия в стехиометрии реакций. FHL-2 комплекс перерабатывает две молекулы формата для того, чтобы перенести два электрона на гидрогеназу Нуд-4 (по аналогии с FHL-1) и еще дополнительно два электрона на пул хинонов. В соответствии с описанным механизмом уравнение для описания концентрации формата принимает вид:

$$\frac{d}{dt} FRM_c = k_{S_{FRM}}(u) - k_{flow} \cdot FRM_c - V_{form,FRM,FHL2} - V_{form,FRM_2,FHL2} \quad (3.29)$$

Процессы синтеза формата (3.1), синтеза FdhF мономеров, сборки Nrg комплекса и связывание с субстратами (3.23)–(3.27), а также скорость работы АТФ-синтазы (3.20), (3.21), аналогичны таковым в сценарии 1, а процессы сборки ферментативного комплекса FHL-2 из субъединиц FdhH и Нуд-4 и утилизации субстратов происходят согласно вышеприведенной схеме, и описаны системой

уравнений (3.30):

$$\left\{ \begin{aligned}
 \frac{d}{dt} FdhF_c &= ks_{FdhF} \cdot m_{FdhF} - V_{form,FHL2} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FdhF_c, \\
 \frac{d}{dt} Hyd_{4,c} &= ks_{hyf} \cdot m_{hyf} - V_{form,FHL2} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot Hyd_{4,c}, \\
 \frac{d}{dt} FHL2_c &= V_{form,FHL2} - V_{form,FRM,FHL2} + V_{util,FHL2} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL2_c, \\
 \frac{d}{dt} FHL2FRM_c &= V_{form,FRM,FHL2} - V_{form,FRM_2,FHL2} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL2FRM_c, \\
 \frac{d}{dt} FHL2FRM_{2,c} &= V_{form,FRM_2,FHL2} - V_{form,H,FRM_2,FHL2} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL2FRM_{2,c}, \\
 \frac{d}{dt} FHL2HFRM_{2,c} &= V_{form,H,FRM_2,FHL2} - V_{form,H_2,FRM_2,FHL2} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL2HFRM_{2,c}, \\
 \frac{d}{dt} FHL2H_2FRM_{2,c} &= V_{form,H_2,FRM_2,FHL2} - V_{form,H_3,FRM_2,FHL2} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL2H_2FRM_{2,c}, \\
 \frac{d}{dt} FHL2H_3FRM_{2,c} &= V_{form,H_3,FRM_2,FHL2} - V_{form,H_4,FRM_2,FHL2} - (k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL2H_3FRM_{2,c}, \\
 \frac{d}{dt} FHL2H_4FRM_{2,c} &= V_{form,H_4,FRM_2,FHL2} - V_{form,DMK,H_4,FRM_2,FHL2} - \\
 &-(k_{d,c} + k_{flow}) \cdot FHL2H_4FRM_{2,c}, \\
 \frac{d}{dt} FHL2DMKH_4FRM_{2,c} &= V_{form,DMK,H_4,FRM_2,FHL2} - V_{util,FHL2} - k_{flow} \cdot FHL2DMKH_4FRM_{2,c}.
 \end{aligned} \right. \quad (3.30)$$

где синтез субъединиц гидрогеназы Hyd-4 пропорционален активности кодирующего их оперона hyf :

$$m_{hyf} = \frac{\delta_{hyf,0} + \delta_{hyf,1} \cdot \left(\frac{u}{K_{hyf}}\right)^{h_{hyf}}}{1 + \left(\frac{u}{K_{hyf}}\right)^{h_{hyf}}} \quad (3.31)$$

Мономер FDH-H и четыре субъединицы гидрогеназы Hyd-4 – HyfA, HyfH, HyfI и HyfG [Andrews et al., 1997] – образуют комплекс FHL-2. Поскольку мономеры гидрогеназы нарабатываются с одного оперона, то их концентрации в модели приняты равными и обозначаются одной переменной Hyd_4 . Таким образом, процесс формирования форматлиазного комплекса описывается уравнением:

$$V_{form,FHL2} = k_{FHL2} \cdot \left(\frac{FdhF_c \cdot Hyd_{4,c}^4}{K_{dis,FHL2}^4} - FHL2_c \right) \quad (3.32)$$

Скорости формирования комплексов FHL-2 с форматом, протонами и хинонами имеют вид:

$$V_{form,FRM,FHL2} = k_{FRM,FHL2} \cdot \left(\frac{FHL2_c \cdot FRM_c}{K_{dis,FRM,FHL2}} - FHL2FRM_c \right), \quad (3.33)$$

$$V_{form,FRM_2,FHL2} = k_{FRM,FHL2} \cdot \left(\frac{FHL2FRM_c \cdot FRM_c}{K_{dis,FRM,FHL2}} - FHL2FRM_{2,c} \right), \quad (3.34)$$

$$V_{form,H,FRM_2,FHL2} = k_{FRM_2,H,FHL2} \cdot \left(\frac{FHL2FRM_{2,c} \cdot H_{in}}{K_{dis,FRM_2,H,FHL2}} - FHL2HFRM_{2,c} \right), \quad (3.35)$$

$$V_{form,H_2,FRM_2,FHL2} = k_{FRM_2,H,FHL2} \cdot \left(\frac{FHL2HFRM_{2,c} \cdot H_{in}}{K_{dis,FRM_2,H,FHL2}} - FHL2H_2FRM_{2,c} \right), \quad (3.36)$$

$$V_{form,H_3,FRM_2,FHL2} = k_{FRM_2,H,FHL2} \cdot \left(\frac{FHL2H_2FRM_{2,c} \cdot H_{in}}{K_{dis,FRM_2,H,FHL2}} - FHL2H_3FRM_{2,c} \right), \quad (3.37)$$

$$V_{form,H_4,FRM_2,FHL2} = k_{FRM_2,H,FHL2} \cdot \left(\frac{FHL2H_2FRM_{2,c} \cdot H_{in}}{K_{dis,FRM_2,H,FHL2}} - FHL2H_4FRM_{2,c} \right), \quad (3.38)$$

$$V_{form,DMK,H,FRM,FHL2} = k_{DMK,FRM_2,H,FHL2} \cdot \left(\frac{FHLH_4FRM_{2,c} \cdot DMK}{K_{dis,DMK,FRM_2,H_4,FHL2}} - FHL2DMKH_4FRM_{2,c} \right), \quad (3.39)$$

$$V_{util,FHL2} = kcat_{FHL2} \cdot FHL2DMKH_4FRM_{2,c}. \quad (3.40)$$

Здесь k_{FHL2} , $k_{FRM,FHL2}$, $k_{FRM_2,H,FHL2}$, $k_{DMK,FRM_2,H,FHL2}$ – константы распада комплексов FHL-2 и его соединений с субстратами – форматом, протонами и диметилхиноном; $K_{dis,FHL2}$, $K_{dis,FRM,FHL2}$, $K_{dis,FRM_2,FHL2}$, $K_{dis,DMK,FRM_2,FHL2}$ – константы диссоциации комплекса FHL-2 и формата ($FHLFRM_c$ и $FHL2FRM_{2,c}$), цитоплазматических протонов ($FHL2HFRM_{2,c}$, $FHL2H_2FRM_{2,c}$, $FHL2H_3FRM_{2,c}$, $FHL2H_4FRM_{2,c}$) и молекул хинона ($FHL2DMKH_4FRM_{2,c}$) соответственно; $kcat_{FHL2}$ – константа оборота FHL-2.

Переменными в уравнениях выступают концентрации веществ, обозначенных следующим образом: FRM_c – концентрация формата в цитоплазме, DMK , $DMKH_2$ – концентрации окисленного и восстановленного диметилменахиона в мембране, H_{in} – концентрация протонов в цитоплазме, $FHL2$ – концентрация активной формы FHL-2. H_{in} – концентрация протонов в цитоплазме,

3.3.3. Оценка параметров математических моделей по сценариям 1 и 2

Оценка параметров моделей М3 и М4 проводилась на основании известных экспериментальных данных как прямых, так и косвенных, по кинетике

ферментативных реакций, в результате которых формируется цепь передачи электронов, а также данных об экспрессии оперонов, кодирующих структуру FHL-1 и FHL-2 ферментных комплексов, и других ферментов респираторной цепи [Axley et al., 1991; Hopper et al., 1994; Etzold et al., 1997; Richard et al., 1999; Wang, Gunsalus, 2003; Maeda et al., 2007].

В моделях М3 и М4 принято, что концентрация фермента Fdh-H в цитоплазме клетки пропорциональна относительной активности химерного белка FdhF- β -gal [Wang, Gunsalus, 2003]. Функция m_{fdhF} , описывающая экспрессию оперона *fdhF* в зависимости от концентрации подаваемого в хеостат нитрита, была адаптирована к этим экспериментальным данным [Wang, Gunsalus, 2003], и результаты ее адаптации показаны на рис. 26а синей кривой. Что касается функций m_{hyc} и m_{hyb} в модели М3, то их вид был установлен на основании косвенных данных о том, что экспрессия оперонов *hyc* и *hyb*, кодирующих структурные субъединицы гидрогеназы Hyd-3 (HycB, HycF, HycG и HycE) и гидрогеназы Hyd-2 (HybA, HybO и HybC), подвержена отрицательной регуляции со стороны нитрата через NarP и NarL белки [Hopper et al., 1994, Richard et al., 1999]. Поскольку NarP и NarL транскрипционные факторы чувствительны и к присутствию нитрита, то в процессе моделирования было сделано предположение о возможном негативном влиянии нитрита на активность *hyc* и *hyb* оперонов через общую систему транскрипционных факторов для обоих метаболитов.

Предположение о возможности негативного влияния нитрита на транскрипцию оперона *hyf* (в модели М4) было сделано на основании данных о негативном влиянии нитрита на транскрипцию всех остальных оперонов, вовлеченных в нитрат-нитритную респираторную систему, а именно: *nrf*, *fdhF* и *pfl* оперонов.

Оценка параметров функций m_{hyc} , m_{hyb} и m_{hyf} была получена в ходе адаптации расширенной модели к экспериментальным данным [Wang, Gunsalus, 2000] и представлена на рис. 26а и рис. 26б.

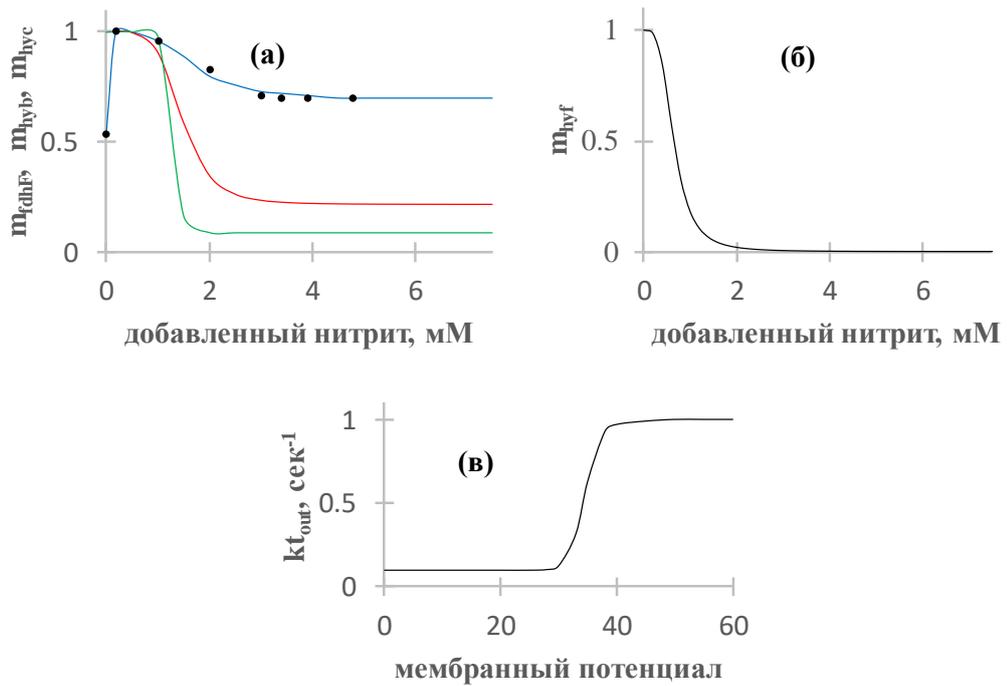


Рис. 26. Зависимости активностей оперонов *fdhF*, *hyb*, *hyc* (а) и *hyf* (б) от концентрации нитрита в хемостате, рассчитанные по моделям М3 (а) и М4 (б) Теоретические кривые $m_{fdhF}(u)$, $m_{hyb}(u)$, $m_{hyc}(u)$ и $m_{hyf}(u)$ обозначены синим, красным, зеленым и черными цветами соответственно. Ось абсцисс – концентрация нитрита в хемостате (мМ). Точки – экспериментальные значения активности химерного белка FdhF-β-gal, измеренные в работе [Wang, Gunsalus, 2003]. (в) – зависимость скорости транспорта субъединиц периплазматических ферментов из цитоплазмы в периплазму в зависимости от величины мембранного потенциала (PMF).

В моделях М3 и М4 принято, что максимальная концентрация формата в цитоплазме может достигать значения 20 мМ, которое оценено из данных [Leonhartsberger et al., 2002].

Величина мембранного потенциала определяет скорость секреции субъединиц периплазматических ферментов из цитоплазмы в периплазму и зависит от разности концентраций протонов в периплазме и цитоплазме. Их оценка была проведена на основании данных [Wilks et al., 2007], согласно которым внутри клетки поддерживается рН близкий к оптимальному (рН 7.8), тогда как в периплазме он определяется в основном рН окружающей среды. В условиях хемостата рН среды поддерживается постоянным и равным 6.5, что и определяет концентрацию протонов в периплазме (kH_{out}), равную $3 \cdot 10^{-4}$ мМ. В силу этого в условиях проточного хемостата величина мембранного потенциала зависит от скорости оттока протонов из цитоплазмы, которая определяется активностью форматгидрогеназного комплекса в процессе окисления формата.

Экспериментальное подтверждение положительного влияния потенциала на скорость транспорта периплазматических белков [Rodrigue et al., 1999], обозначенной в моделях M3 и M4 как kt_{out} , определило вид функции, а значения входящих в нее констант были подобраны в процессе адаптации полной модели к экспериментальным данным. Результаты представлены на рис. 26в. Зависимость величины мембранного потенциала от концентрации добавленного нитрита, вычисленная по результатам расчета моделей M3 и M4, соответствует экспериментальным данным [Pope, Cole, 1982].

Каждая из моделей M3 и M4, характеризующая процессы формирования мембранного потенциала, была объединена с частью модели M2, описывающей процессы цитоплазматической утилизацией нитрита и процессы синтеза и транспорта субъединиц периплазматической нитритредуктазы (см. параграф 2.3). Для краткости обозначим эти модели как M2/3 и M2/4 соответственно. Параметры, при которых проводились расчеты расширенных моделей M2/3 и M2/4, приведены в таблицах 6–8. В табл. 6 указаны значения тех параметров, относящихся к модели M2, которые отличаются от приведенных в табл. 5 (глава 2).

Таблица 6. Список одинаковых параметров для моделей M2/3 и M2/4

Обозначение параметра	Название	Значение параметра	Ссылка на литературу
$k_{SNrf,A_c} = k_{SNrf,B_c}$	Максимальная удельная скорость синтеза белков NrfA и NrfB	$3.6 \cdot 10^{-5}$ мМ/сек	[*]
$k_{Nrf,H,u,Nrf}$	Константа распада комплекса, состоящего из NrfA ₂ B ₂ , NO ₂ и протонов	10 сек ⁻¹	[*]
$K_{dis,H,u,Nrf}$	Константа диссоциации комплекса, состоящего из NrfA ₂ B ₂ , нитрита и протонов	$4 \cdot 10^{-6}$ мМ	[Clarke et al., 2008]
$k_{Nrf,DMKH2,H,u,Nrf}$	Константа распада комплекса, состоящего из NrfA ₂ B ₂ , нитрита, протонов и менахинола	10 сек ⁻¹	[*]
$K_{dis,DMKH2,H,u,Nrf}$	Константа диссоциации комплекса, состоящего из NrfA ₂ B ₂ , нитрита, протонов и менахинола	0.5 мМ	[*]
kt_0	Константы, входящие в функцию kt_{out} влияния мембранного потенциала на транспорт NrfA и NrfB в периплазму	0.1	[*]
w_{kt}		1	
$K_{t,PMF}$		34.5	
$h_{kt,PMF}$		25	
$\delta_{fdhF,0}$	Параметры, входящие в функцию m_{fdhF} , описывающую влияние нитрита на уровень экспрессии мономера Fdh-H	0.55	[Wang, Gunsalus, 2003]
$\delta_{fdhF,1}$		1	
$K_{fdhF,1}$		0.05 мМ	
$h_{fdhF,1}$		3.5	
$\delta_{fdhF,2}$		0.69	
$K_{fdhF,2}$		0.34 мМ	
$h_{fdhF,2}$		7.5	
$k_{atp,0}$		0.004	[*]

w_{atp}	Параметры, описывающие k_{atp} влияние мембранного потенциала на скорость синтеза АТФ	4.7	
$K_{atp,PMF}$		37	
$h_{atp,PMF}$		20	
$k_{cat,ATPase}$	Каталитическая константа АТФ-синтазы	300 сек ⁻¹	[Etzold et al., 1997]
$K_{M,ATPase}$	Константа Михаэлиса АТФ-синтазы для протонов	1·10 ⁻⁵ мМ	[*]
$ATPase$	Концентрация АТФ-синтазных комплексов в клетке	3.3·10 ⁻³ мМ	[*]
$k_{H_{out}}$	Концентрация протонов в периплазме	3.16·10 ⁻⁴ мМ	[*]
$ks_{FRM,0}$	Константа синтеза формата в ходе гликолиза	1.3534 мМ/сек	[*]
$w_{iNO_2,FRM}$	Параметры, входящие в функцию ks_{FRM} , описывающую ингибирование синтеза формата нитритом	0.64	[Kaiser et al., 1995]
$K_{u,FRM}$		2.3 мМ	
$h_{u,FRM}$		7	
ks_{nirC}	Константа синтеза NirC мономеров	3.5·10 ⁻⁵ мМ/сек	[*]
$K_{dis,NirB_2}$	равновесная константа диссоциации реакции формирования NirB ₂	0.002 мМ	[*]
$K_{dis,NirB_2D}$	равновесная константа диссоциации реакции формирования тримера NirB ₂ D	0.002 мМ	[*]
$K_{dis,NirC_{su}} = K_{M,NirCin}$	константа Михаэлиса процесса импорта нитрита в клетку белком NirC	0.5 мМ	[*]
$k_{cat,NirCout}$	каталитическая константа скорости экспорта нитрита из клетки белком NirC	800 сек ⁻¹	[*]
$K_{dis,NirC_{sw}}$	константа Михаэлиса процесса экспорта нитрита из клетки белком NirC	0.5 мМ	[*]

Размерность параметров обозначена: мМ – миллимоль на литр, сек – секунды, если размерность не указана, то величина является безразмерной.

*– значение параметра подобрано в результате численных экспериментов.

Таблица 7. Список отдельных параметров для модели M2/3

Обозначение параметра	Название	Значение параметра ^a	Ссылка на литературу
ks_{hyc}	Константа синтеза мономеров, входящих в состав гидрогеназы 3	2.5·10 ⁻⁴ мМ/сек	[*]
ks_{fdhF}	Константа синтеза Fdh-H мономеров	2.5·10 ⁻⁴ мМ/сек	[*]
ks_{DMKH2}	Константа синтеза хинола	1.05·10 ⁻⁴ мМ/сек	[*]
ks_{Hin}	Базовая скорость наработки протонов в периплазме	0.15 мМ/сек	[*]
k_{FHL1}	Константа распада комплекса FHL-1	10 сек ⁻¹	[*]
$K_{dis,FHL1}$	Константа диссоциации комплекса FHL-1	0.5 мМ	[*]
$k_{FRM,FHL1}$	Константа распада комплекса, состоящего из FHL-1 и формата	10 сек ⁻¹	[*]
$K_{dis,FRM,FHL1}$	Константа диссоциации комплекса, состоящего из FHL-1 и формата	12.2 мМ	[Axley, Grahame, 1991]
$k_{H,FRM,FHL1}$	Константа распада комплекса, состоящего из FHL-1, формата и протонов	10 сек ⁻¹	[*]
$K_{dis,H,FRM,FHL1}$	Константа диссоциации комплекса, состоящего из FHL-1, формата и протонов	1·10 ⁻⁵ мМ	[*]
$k_{cat,FHL1}$	Константа оборота фермента FHL-1	2833 сек ⁻¹	[Axley, Grahame, 1991]
ks_{hyd}	Константа синтеза мономеров, входящих в состав Нуд-2 комплекса	0.237 мМ/сек	[*]
$k_{Нуд_2}$	Константа распада комплекса Нуд-2 на мономеры	10 сек ⁻¹	[*]

K_{disHyd_2}	Равновесная константа диссоциации комплекса Hyd-2	0.05 мМ	[*]
k_{Hyd_2,H_2}	Константа распада комплекса, состоящего из Hyd-2 и водорода	10 сек ⁻¹	[*]
K_{dis,Hyd_2,H_2}	Константа диссоциации комплекса, состоящего из Hyd-2 и водорода	2·10 ⁻³ мМ	[Sawers et al., 1986]
$k_{Hyd_2,H_2,DMK}$	Константа распада комплекса, состоящего из Hyd-2, водорода и хинона	10 сек ⁻¹	[*]
$K_{dis,Hyd_2,H_2,DMK}$	Константа диссоциации комплекса, состоящего из Hyd-2, водорода и хинона	0.1 мМ	[*]
k_{cat,Hyd_2}	Константа оборота фермента Hyd-2	1314 сек ⁻¹	[Maeda et al., 2007]
$k_{H_2,out}$	Константа диффузии водорода из периплазмы в окружающую среду	1 сек ⁻¹	[*]
$\delta_{hyd,0}$	Параметры, входящие в функцию m_{hyd} , описывающую влияние нитрита на уровень экспрессии мономеров гидрогеназы 2	0.218	[*]
$\delta_{hyd,1}$		1	
$K_{hyd,1}$		1.47 мМ	
$h_{hyd,1}$		5.2	
$\delta_{fdhF,0}$	параметры, входящие в функцию m_{hyc} , описывающую влияние нитрита на уровень экспрессии мономеров, входящих в комплекс гидрогеназы 3	0.1	[*]
$\delta_{fdhF,1}$		1.05	
$K_{fdhF,1}$		0.1 мМ	
$h_{fdhF,1}$		2	
$\delta_{fdhF,2}$		0.088	
$K_{fdhF,2}$		0.88 мМ	
$h_{fdhF,2}$		15	

Размерность параметров обозначена: мМ – миллимоль на литр, сек – секунды, если размерность не указана, то величина является безразмерной.

* – значение параметра подобрано в результате численных экспериментов.

Таблица 8. Список отдельных параметров для модели M2/4

Обозначение параметра	Название	Значение параметра	Ссылка на литературу
ks_{hyf}	Константа синтеза субъединиц, входящих в состав гидрогеназы 3	1.69 мМ/сек	[*]
ks_{fdhF}	Константа синтеза Fdh-H мономеров	1.69 мМ/сек	[*]
ks_{DMKH_2}	Константа синтеза хинола	5·10 ⁻⁵ мМ/сек	[*]
ks_{Hin}	Базовая скорость наработки протонов в периплазме	1.2 мМ/сек	[*]
k_{FHL_2}	Константа распада комплекса FHL-2	10 сек ⁻¹	[*]
K_{dis,FHL_2}	Константа диссоциации комплекса FHL-2	0.5 мМ	[*]
k_{FRM,FHL_2}	Константа распада комплекса, состоящего из FHL-2 и формата	10 сек ⁻¹	[*]
K_{dis,FRM,FHL_2}	Константа диссоциации комплекса, состоящего из FHL-2 и формата	12.2 мМ	[Axley, Grahame, 1991]
k_{FRM_2,H,FHL_2}	Константа распада комплекса, состоящего из FHL-2, формата и протонов	10 сек ⁻¹	[*]
K_{dis,FRM_2,H,FHL_2}	Константа диссоциации комплекса, состоящего из FHL-2, формата и протонов	5·10 ⁻⁵ мМ	[*]
k_{FRM_2,H,DMK,FHL_2}	Константа распада комплекса, состоящего из FHL-2, формата, протонов и хинона	10 сек ⁻¹	[*]
$K_{dis,FRM_2,DMK,H_4,FHL_2}$	Константа диссоциации комплекса, состоящего из FHL-2, формата, протонов и хинона	5·10 ⁻³ мМ	[*]
k_{cat,FHL_2}	Константа оборота фермента FHL-2	2833 сек ⁻¹	[Axley, Grahame, 1991]

$\delta_{hyf,0}$	Параметры, входящие в функцию m_{hyd} , описывающую влияние нитрита на уровень экспрессии мономеров гидрогеназы 4	1	[*]
$\delta_{hyf,1}$		0.003	
K_{hyf}		0.65 мМ	
h_{hyf}		3.5	

Размерность параметров обозначена: мМ – миллимоль на литр, сек – секунды, если размерность не указана, то величина является безразмерной.

*– значение параметра подобрано в результате численных экспериментов.

3.3.4. Влияние различных механизмов формирования мембранного потенциала на динамику накопления нитрита в хемостате

Результаты численных экспериментов расширенной модели, описывающей молекулярно-генетические и метаболические процессы, обеспечивающие процессы анаэробного дыхания клеток *E. coli* на нитрите, в которой мембранный потенциал формируется в результате двух различных гипотетических механизмов, с участием FHL-1 (сценарий 1, модель M2/3) и FHL-2 (сценарий 2, модель M2/4) форматгидрогенлиазных комплексов, показаны на рис. 27а и рис. 27б. Для моделей M2/3 и M2/4 были рассчитаны значения *CKO*, которые равны 0.003, что означает более хорошую степень адаптации полученных моделей по сравнению с моделью M2 и, тем более, с M1. Из результатов моделирования видно, что в обоих случаях теоретические расчеты общей скорости утилизации нитрита (синяя кривая) хорошо согласуются с экспериментально наблюдаемой кинетикой (точки) утилизации нитрита в хемостате и предполагают влияние мембранного потенциала на скорость утилизации нитрита в области низких (~1 мМ) концентраций субстрата. Расчеты значений скорости утилизации нитрита Nrf редуктазой согласно модели M1, в которой мембранный потенциал не влияет на транспорт периплазматических Nrf субъединиц (красные пунктирные линия) и моделей M2/3 и M2/4, в которых это влияние учитывается (красные сплошные линии на рис. 27а, б), показали, что разница активностей Nrf редуктаз между этими вариантами составляет более 50%.

Качественно одинаковая зависимость скорости утилизации нитрита периплазматической редуктазой от концентрации подаваемого нитрита, полученная для двух разных сценариев формирования потенциала, свидетельствует о том, что природа мембранного потенциала может быть не очень важна и зависеть от конкретных условий внешней среды (например, pH, концентрации субстрата, источника энергии и др.), влияющих на активность тех или иных ферментов, участвующих в формировании цепи передачи электронов.

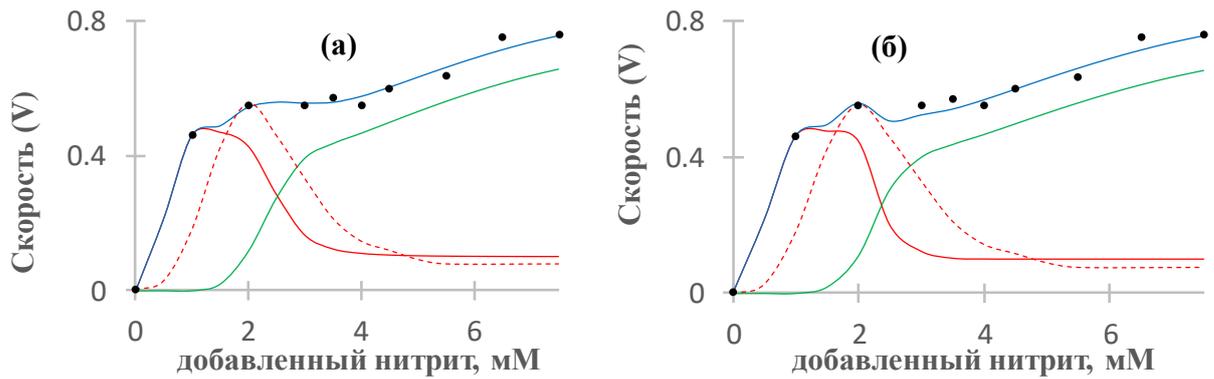


Рис. 27. Скорость переработки нитрита культурой клеток *E. coli* в зависимости от уровня добавленного нитрита в хемостат (мМ). Точки – экспериментальные данные по скорости утилизации нитрита популяцией клеток, вычисленные на основе данных работы [Wang et al., 1999]. Сплошные линии – результаты расчетов моделей M2/3 (а) и M2/4 (б). Красная сплошная линия – скорость утилизации нитрита периплазматической Nrf редуктазой. Красная пунктирная линия – скорость утилизации нитрита периплазматической Nrf редуктазой, рассчитанная по модели M2 с нерегулируемым транспортом субъединиц в периплазму ($dU=0$). Зеленая линия – скорость утилизации нитрита цитоплазматической NirB редуктазой. Синяя линия – общая скорость утилизации нитрита. Параметры для расчета моделей представлены в таблицах 6–8.

В ходе реконструкции сценариев формирования мембранного потенциала с использованием нитрита в качестве акцептора электронов были учтены условия культивирования клеток в проточном хемостате с фиксированной концентрацией глюкозы, обеспечивающей определенную скорость роста, плотность культуры и pH среды. Все эти внешние условия влияют на активность ферментов форматгидрогенлиазных комплексов и респираторных гидрогеназ и определяют выбор элементов дыхательной цепи. Обе модели M3 и M4, построенные с учетом сценариев формирования дыхательной цепи с участием FHL-1 и FHL-2 форматгидрогенлиазных комплексов, корректно описывают имеющиеся экспериментальные данные по кинетике утилизации нитрита в условиях стационарного роста культуры клеток *E. coli* в проточном хемостате.

Необходимо отметить, что детальная реконструкция механизмов формирования цепи передачи электронов в клетках *E. coli* в условиях дыхания на нитрите позволила не только создать подробную структурную модель утилизации нитрита, но и предсказать зависимость регуляции неизученных ранее оперонов от уровня нитрита в среде. Поскольку для *E. coli* частым случаем является наличие нескольких дублирующих ферментативных систем, то не исключено, что оба сценария могут реализовываться при различных внешних условиях.

Таким образом, результаты математического моделирования доказывают, что мембранный потенциал является необходимым механизмом регуляции активности периплазматической Nrf нитритредуктазы и утилизации нитрита при низких концентрациях субстрата в среде. Данный механизм дополняет регуляцию уровня транскрипции *nrf* оперона нитритом. Не исключено, что этот механизм имеет более широкое распространение и может быть важен для других периплазматических ферментов, локальная активность которых в периплазме зависит не только от скорости их синтеза в цитоплазме, но и от скорости секреции их компонентов в периплазму. По крайней мере, механизмы секреции субъединиц Nrf редуктазы *E. coli* в периплазму связаны с наличием в их структуре трансмембранных последовательностей, узнаваемых белками-транспортерами системы Tat [Price, Driessen, 2010], которые широко распространены у других видов бактерий и встречаются в хлоропластах [Aldridge et al., 2012], бактериальное происхождение которых в настоящее время доказано [Dyall et al., 2004; Zimorski et al., 2014].

Заключение

Процессы денитрификации у бактерий тесно связаны с метаболизмом нитрата и нитрита и наработкой энергии в анаэробных условиях. У бактерии *E. coli* анаэробные условия являются наиболее характерными для естественных мест ее обитания (кишечник млекопитающих и человека в частности). В анаэробной респираторной системе *E. coli* нитрат является наиболее выгодным с точки зрения продукции АТФ, однако в процессе его утилизации синтезируются токсические для клетки вещества, и нитрит является одним из таких. И тем не менее нитрит не только утилизируется бактерией *E. coli* внутриклеточно, но также используется в респираторной системе анаэробного дыхания в качестве акцептора электронов, хотя и с меньшей эффективностью по сравнению с нитратом. Координация взаимодействия всех компонентов нитрит-нитратной системы у *E. coli* с этой точки зрения представляет особый интерес.

Имеющиеся данные по молекулярно-генетическим механизмам регуляции активности *nrf* и *nir* оперонов, кодирующих структуру ферментов, утилизирующих и транспортирующих нитрит, позволили разработать модель утилизации нитрита клетками *E. coli* при культивировании их в проточном хемостате в глюкозо-лимитированных условиях стационарного роста и исследовать вклад различных компонентов системы в контроль внутриклеточного содержания нитрита. Была разработана базовая модель M1 утилизации нитрита в хемостате, в которой для описания процессов регуляции транскрипции субъединиц ферментов используются обобщенные функции Хилла. Анализ базовой модели показал, что модель описывает кинетику накопления нитрита в хемостате в области миллимолярных концентраций (больше 2 мМ) добавленного в хемостат субстрата без дополнительных предположений. В данной области, согласно модели, внутриклеточная концентрация нитрита не превышает 0.1 мМ на всем интервале изменения добавленного нитрита, что вполне соответствует представлению, что при более высоких концентрациях нитрит токсичен для бактерии, и в клетке существуют механизмы поддержания его концентрации на низком физиологическом уровне. Согласно расчетам базовой модели низкий уровень внутриклеточного нитрита можно наблюдать при различных соотношениях импортно-экспортных активностей

NirC транспортера, что позволяет считать скорости транспорта и цитоплазматической утилизации нитрита свободными параметрами. Таким образом, расчеты базовой модели показали, что для количественной оценки скоростей требуется проведение дополнительных экспериментов.

Теоретический анализ базовой модели касательно функционирования системы утилизации нитрита в области концентраций добавленного субстрата меньше 1 мМ показал, что генетической компоненты регуляции Nrf редуктазы недостаточно для описания экспериментальных данных. Оценка скорости утилизации нитрита Nrf нитритредуктазой показала, что в этой области рассчитанная активность фермента приблизительно в два раза ниже полученной из экспериментальных данных. На основании этих результатов было высказано предположение о существовании в области микромолярных концентраций нитрита дополнительного источника нитрит-утилизирующей активности, природа которого не известна.

Дополнительная нитрит-утилизирующая активность была теоретически предсказана на основании базовой модели M1, процессы синтеза и сборки ферментов в которой рассмотрены в стационаре, поэтому была разработана более сложная структурная модель M2, в которой процессы формирования белковых комплексов, ферментативные реакции, транспорт из цитоплазмы в периплазму, процессы деградации белков и их комплексов были описаны биохимическими неравновесными реакциями. Анализ модели M2 подтвердил предположение, выдвинутое на основании анализа модели M1, о необходимости привлечения дополнительной нитрит-утилизирующей активности для объяснения экспериментальных данных по кинетике утилизации нитрита в области низких значений субстрата.

Для объяснения природы дополнительной нитрит-утилизирующей активности были выдвинуты ряд гипотез и проведен их анализ, который показал, что механизм локального изменения концентрации Nrf фермента при переходе его из цитоплазмы в периплазматическое пространство клетки под действием мембранного потенциала при низких концентрациях нитрита является необходимым для объяснения кинетики накопления нитрита в хеостате и не противоречит имеющимся экспериментальным данным о возможности влияния потенциала на

транспорт белков в периплазму и согласуется с данными об области концентрации нитрита, в которой формируется потенциал.

Для подтверждения этого вывода была проведена реконструкция молекулярно-генетических механизмов формирования мембранного потенциала в условиях дыхания на нитрите. Было предложено два гипотетических сценария его формирования с участием форматгидрогеназных комплексов FHL-1 и FHL-2 и разработаны соответствующие структурные модели, которые были интегрированы с моделью утилизации нитрита в хемостате. Анализ расширенной модели показал, что оба сценария равноценны с точки зрения формирования мембранного потенциала, что позволяет предположить возможность их реализации при различных условиях культивирования клеток, определяющих активность тех или иных ферментов респираторного пути.

Таким образом, без учета молекулярно-генетических механизмов формирования мембранного потенциала нельзя воспроизвести экспериментально наблюдаемую динамику утилизации нитрита клетками *E. coli* в проточном хемостате, что позволяет считать мембранный потенциал составной частью механизма регуляции активности периплазматической Nrf редуктазы у *E. coli*. Не исключено, что этот механизм имеет более широкое распространение и может быть важен для других периплазматических ферментов.

Выводы

1. Разработана математическая модель (M1) утилизации нитрита клетками *E. coli* в глюкозо-лимитированных условиях хемостата, учитывающая механизмы регуляции экспрессии генов, кодирующих структуру ферментов, утилизирующих и транспортирующих нитрит.
2. Показано, что учтенные в модели (M1) молекулярно-генетические и биохимические механизмы утилизации нитрита достаточны для адекватного описания экспериментально наблюдаемой динамики его накопления в хемостате при концентрациях добавленного в среду нитрита выше 2 мМ.
3. Установлено, что при концентрациях добавленного нитрита менее 2 мМ активность Nrf нитритредуктазы, прогнозируемая на основе молекулярно-генетических данных, обеспечивает только около 50% экспериментально наблюдаемой нитрит утилизирующей активности.
4. Предложена гипотеза, объясняющая возникновение дополнительной нитрит утилизирующей активности при концентрациях добавленного нитрита менее 2 мМ локальным повышением концентрации Nrf нитритредуктазы в периплазме при активизации перехода субъединиц фермента из цитоплазмы в периплазму под действием мембранного потенциала, формирование которого является следствием активности ферментов респираторной цепи.
5. На основе модели (M1) разработана двухкомпарментная математическая модель (M2) утилизации нитрита в хемостате, в которой дополнительно учтены процесс транспорта субъединиц Nrf нитритредуктазы из цитоплазмы в периплазму и зависимость его скорости от наличия и величины мембранного потенциала.
6. Показано, что учтенные в модели M2 данные по кинетике формирования мембранного потенциала в зависимости от концентрации нитрита достаточны для корректного описания динамики накопления нитрита в хемостате, что позволяет считать мембранный потенциал существенным компонентом в механизме регуляции активности периплазматической Nrf редуктазы у *E. coli* при концентрациях добавленного нитрита в среде менее 1 мМ.
7. Реконструированы вероятные сценарии формирования электрического потенциала на мембране клеток *E. coli* в условиях дыхания на нитрите с участием

форматгидрогенлиазных комплексов FHL-1 и FHL-2 и разработаны соответствующие модели. Показано, что модель (M2), сопряженная с процессами формирования мембранного потенциала, корректно воспроизводит динамику утилизации нитрита клетками *E. coli* в проточном хеостате независимо от сценария формирования потенциала, что дополнительно подтверждает важную роль мембранного потенциала в регуляции активности периплазматической Nrf редуктазы.

Список литературы

1. Акбердин И.Р., Казанцев Ф.В., Ермак Т.В., Ри Н.А. Компьютерное моделирование динамики функционирования молекулярно-генетических систем *Escherichia coli*. IV МК «Математическая биология и биоинформатика» (г. Пущино, Россия), – 2012, – С. 108-109.
2. Системная компьютерная биология / Под ред. Иванисенко В.А., Лихошвай В.А., Колчанов Н.А., Гончаров С.С. – Новосибирск: СО РАН, 2008. – 769 с.
3. Ри Н.А, Лихошвай В.А., Хлебодарова Т.М. Мембранный потенциал как механизм регуляции активности периплазматической нитритредуктазы: математическая модель // Матем. Биол. Биоинформ. – 2018. – Т. 13. – №2. – С. 238-269.
4. Ри Н.А, Лихошвай В.А., Хлебодарова Т.М. О механизмах утилизации нитрита клетками *Escherichia coli* при культивировании их в условиях стационарного роста // Математическая биология и биоинформатика. – 2015. – Т.10. - №1. – С. 193–205.
5. Ри Н.А., Хлебодарова Т.М., Когай В.В., Фадеев С.И., Лихошвай В.А. Бистабильность системы утилизации нитрита *Escherichia coli*: анализ математической модели // Сиб. журн. индустр. матем. – 2012. – Т. 15. – №4. – С. 110–117.
6. Ри Н.А., Хлебодарова Т.М., Когай В.В., Фадеев С.И., Лихошвай В.А. Математическое моделирование метаболизма нитрита при культивировании клеток *Escherichia coli* в проточном хемостате. IV МК «Математическая биология и биоинформатика» (г. Пущино, Россия), – 2012. – С. 117-118.
7. Ри Н.А., Хлебодарова Т.М., Лихошвай В.А. О механизмах утилизации нитрита клетками *Escherichia coli* при микромолярных концентрациях субстрата в хемостате. Доклады V МК «Математическая биология и биоинформатика» (г. Пущино, Россия), – 2014. – С.114-115.
8. Биохимия/ Под ред. Страйер Л. – М.: Мир, 1984. – Т.1 – 232 с.
9. Фадеев С. И., Гайнова И. А. Пакет программ "STEP" для численного исследования систем нелинейных уравнений // Препринт ИМ СО РАН (Новосибирск). – 1994. № 13. – С. 1-32.
10. Хлебодарова Т.М., Когай В.В., Акбердин И.Р., Ри Н.А., Фадеев С.И., Лихошвай В.А., Моделирование утилизации нитрита клетками *Escherichia coli*: анализ потоков // Математическая биология и биоинформатика. – 2013. – Т.8. – №1. – С. 276- 294.

- 11.Хлебодарова Т.М., Степанова Т.Ю., Ощепков Д.Ю., Тикунова Н.В., Бабкин И.В., Лихошвай В.А. Механизмы регуляции экспрессии гена *dps* *Escherichia coli* в условиях стресса: реконструкция по кинетическим данным // Математическая биология и биоинформатика. – 2015. – Т. 10. – № 1. – С. 1-14
- 12.Akberdin I.R., Kazantsev F.V., Ree N.A. Modeling and analysis of dynamics of the gene networks: automatic generation and storage in a new database. «Международный микросимпозиум Syspatho», (Санкт-Петербург, Россия). – 2012. – С. 67-68.
- 13.Abaibou H., Pommier J., Benoit S., Giordano G., Mandrand-Berthelot M.A. Expression and characterization of the *Escherichia coli* *fdo* locus and a possible physiological role for aerobic formate dehydrogenase // *J Bacteriol.* – 1995. – Vol. 177. – № 24. – P. 7141-7149.
- 14.Abou-Jaoudé A, Chippaux M, Pascal MC. Formate-nitrite reduction in *Escherichia coli* K12. 1. Physiological study of the system // *Eur J Biochem.* – 1979. – Vol. 95. – № 2. – P. 309-314.
- 15.Aldridge C., Storm A., Cline K., Dabney-Smith C. The chloroplast twin arginine transport (Tat) component, Tha4, undergoes conformational changes leading to Tat protein transport // *J Biol Chem.* – 2012. – Vol. 287. – № 41. – P. 34752-3463.
- 16.Ali Azam T., Iwata A., Nishimura A., Ueda S., Ishihama A. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid // *J. Bacteriol.* – 1999. – Vol. 181. – № 20. – P. 6361-6370.
- 17.Andrews S. C., Berks B. C., McClay J., Ambler A., Quail M. A., Golby P. and Guest J. R. A 12-cistron *Escherichia coli* operon (*hyf*) encoding a putative proton-translocating formate-hydrogenlyase system // *Microbiology.* – 1997. – Vol. 143. – P. 3633-3647.
- 18.Arp D.J., Sayavedra-Soto L.A., Hommes N.G. Molecular biology and biochemistry of ammonia oxidation by *Nitrosomonas europaea* // *Arch Microbiol.* – 2002. – Vol. 178. – № 4. – P. 250-255.
- 19.Axley M.J., Grahame D.A. Kinetics for formate dehydrogenase of *Escherichia coli* formate-hydrogenlyase // *J Biol Chem.* – 1991. – Vol. 266. – № 21. – P. 13731-13736.
- 20.Axley M.J., Grahame D.A., Stadtman T.C. *Escherichia coli* formate-hydrogen lyase. Purification and properties of the selenium-dependent formate dehydrogenase component // *J Biol Chem.* – 1990. – Vol. 265. – № 30. – P. 18213-18218.

21. Bagramyan K., Mnatsakanyan N., Poladian A., Vassilian A., Trchounian A. The roles of hydrogenases 3 and 4, and the F₀F₁-ATPase, in H₂ production by *Escherichia coli* at alkaline and acidic pH // FEBS Lett. – 2002. – Vol. 516. – № 1-3. – P. 172-117.
22. Baikalov I., Schroder I., Kaczor-Grzeskowiak M., Grzeskowiak K., Gunsalus R.P., Dickerson R.E. Structure of the *Escherichia coli* response regulator NarL // Biochemistry. – 1996. – Vol. 35. – № 34. – P. 11053-11061.
23. Ballantine S.P., Boxer D.H. Isolation and characterisation of a soluble active fragment of hydrogenase isoenzyme 2 from the membranes of anaerobically grown *Escherichia coli* // Eur J Biochem. – 1986. – Vol. 156. – № 2. – P. 277-284.
24. Bamford V.A., Angove H.C., Seward H.E., Thomson A.J., Cole J.A., Butt J.N., Hemmings A.M., Richardson D.J. Structure and spectroscopy of the periplasmic cytochrome c nitrite reductase from *Escherichia coli* // Biochemistry. – 2002. – Vol. 41. – № 9. – P. 2921-2931.
25. Bazil J.N., Buzzard G.T., Rundell A.E. Modeling mitochondrial bioenergetics with integrated volume dynamics // PLoS Comput Biol. – 2010. – Vol. 6. – № 1.
26. Bearson S.M., Albrecht J.A., Gunsalus R.P. Oxygen and nitrate-dependent regulation of dmsABC operon expression in *Escherichia coli*: sites for Fnr and NarL protein interactions // BMC Microbiol. – 2002. – Vol. 2. – № 13.
27. Beaulieu J.F., Quaroni A. Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells // Biochem J. – 1991. – Vol. 280. – Pt 3. – P. 599-608.
28. Bentley R., Meganathan R. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria // Microbiol Rev. – 1982. – Vol. 46. – № 3. – P. 241-280.
29. Bertero M.G., Rothery R.A., Boroumand N., Palak M., Blasco F., Ginet N., Weiner J.H., Strynadka N.C. Structural and biochemical characterization of a quinol binding site of *Escherichia coli* nitrate reductase A // J Biol Chem. – 2005. – Vol. 280. – № 15. – P. 14836-14843.
30. Bilous P.T., Weiner J.H. Dimethyl sulfoxide reductase activity by anaerobically grown *Escherichia coli* HB101 // J Bacteriol. – 1985. – Vol. 162. – № 3. – P. 1151-1155.
31. Blaudeck N., Kreutzenbeck P., Muller M., Sprenger G.A., Freudl R. Isolation and characterization of bifunctional *Escherichia coli* TatA mutant proteins that allow efficient tat-dependent protein translocation in the absence of TatB // J Biol Chem. – 2005. – Vol. 280. – № 5. P. 3426-3432.

32. Bonnefoy V., Demoss J.A. Nitrate reductases in *Escherichia coli* // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 1994. – Vol. 66. – № 1-3. – P. 47-56.
33. Bonnefoy V., Ratouchniak J., Blasco F., Chippaux M. Organization of the nar genes at the chlZ locus // *FEMS Microbiol Lett*. – 1997. – Vol. 147. – № 1. – P. 147-149.
34. Bremer H., Dennis P.P. Modulation of Chemical Composition and Other Parameters of the Cell at Different Exponential Growth Rates // *EcoSal Plus*. – 2008. – Vol. 3. – № 1.
35. Brondijk T.H., Fiegen D., Richardson D.J., Cole J.A. Roles of NapF, NapG and NapH, subunits of the *Escherichia coli* periplasmic nitrate reductase, in ubiquinol oxidation // *Mol Microbiol*. – 2002. – Vol. 44. – № 1. – P. 245-255.
36. Browning D.F., Cole J.A., Busby S.J. Regulation by nucleoid-associated proteins at the *Escherichia coli* nir operon promoter // *J Bacteriol*. – 2008. – Vol. 190. – № 21. – P. 7258-7267.
37. Browning D.F., Cole J.A., Busby S.J. Transcription activation by remodelling of a nucleoprotein assembly: the role of NarL at the FNR-dependent *Escherichia coli* nir promoter // *Mol Microbiol*. – 2004. – Vol. 53. – № 1. – P. 203-215.
38. Browning D.F., Grainger D.C., Beatty C.M., Wolfe A.J., Cole J.A., Busby S.J. Integration of three signals at the *Escherichia coli* nrf promoter: a role for Fis protein in catabolite repression // *Mol Microbiol*. – 2005. – Vol. 57. – № 2. – P. 496-510.
39. Cavicchioli R., Chiang R.C., Kalman L.V., Gunsalus R.P. Role of the periplasmic domain of the *Escherichia coli* NarX sensor-transmitter protein in nitrate-dependent signal transduction and gene regulation // *Mol. Microbiol*. – 1996. – Vol. 21. – P. 901–911.
40. Chance E.M. A computer simulation of oxidative phosphorylation // *Comput Biomed Res*. – 1967. – Vol. 1. – P. 251-264.
41. Chen J., Strous M. Denitrification and aerobic respiration, hybrid electron transport chains and co-evolution // *Biochim Biophys Acta*. – 2013. – Vol. 1827. – № 2. – P. 136-144.
42. Chovanec P., Sparacino-Watkins C., Zhang N., Basu P., Stolz J.F. Microbial reduction of chromate in the presence of nitrate by three nitrate respiring organisms // *Front Microbiol*. – 2012. – Vol. 3. – № 416.
43. Clarke T.A., Cole J.A., Richardson D.J., Hemmings A.M. The crystal structure of the pentahaem c-type cytochrome NrfB and characterization of its solution-state interaction with the pentahaem nitrite reductase NrfA // *Biochem. J*. – 2007. – Vol. 406. – P. 19–30.

44. Clarke T.A., Dennison V., Seward H.E., Burlat B., Cole J.A., Hemmings A.M., Richardson D.J. Purification and spectropotentiometric characterization of *Escherichia coli* NrfB, a decaheme homodimer that transfers electrons to the decaheme periplasmic nitrite reductase complex // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 41333–41339.
45. Clarke T.A., Holley T., Hartshorne R.S., Fredrickson J.K., Zachara J.M., Shi L., Richardson D.J. The role of multiheme cytochromes in the respiration of nitrite in *Escherichia coli* and Fe(III) in *Shewanella oneidensis* // *Biochem Soc Trans.* – 2008. – Vol. 36. – Pt 5. – P. 1005-1010.
46. Clarke T.A., Kemp G.L., Van Wonderen J.H., Doyle R.M., Cole J.A., Tovell N., Cheesman M.R., Butt J.N., Richardson D.J., Hemmings A.M. Role of a conserved glutamine residue in tuning the catalytic activity of *Escherichia coli* cytochrome c nitrite reductase // *Biochemistry.* – 2008. – Vol. 47. – № 12. – P. 3789–3799.
47. Clegg S., Yu F., Griffiths L., Cole J.A. The roles of the polytopic membrane proteins NarK, NarU and NirC in *Escherichia coli* K-12: two nitrate and three nitrite transporters // *Mol. Microbiol.* – 2002. – Vol. 44. – P. 143–155.
48. Cole J. Nitrate reduction to ammonia by enteric bacteria: redundancy, or a strategy for survival during oxygen starvation? // *FEMS Microbiol Lett.* – 1996. – Vol. 136. – № 1. – P. 1-11.
49. Cole J.A. Cytochrome c552 and nitrite reduction in *Escherichia coli* // *Biochim Biophys Acta.* – 1968. – Vol. 162. – № 3. – P. 356-368.
50. Coleman K.J., Cornish-Bowden A., Cole J.A. Activation of nitrite reductase from *Escherichia coli* K12 by oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide // *Biochem. J.* – 1978. – Vol. 175. – P. 495–499.
51. Coleman K.J.^a, Cornish-Bowden A., Cole J.A. Purification and properties of nitrite reductase from *Escherichia coli* K12 // *Biochem. J.* – 1978. – Vol. 175. – P. 483–493.
52. Cortassa S., Aon M.A., O'Rourke B., Jacques R., Tseng H.J. A computational model integrating electrophysiology, contraction, and mitochondrial bioenergetics in the ventricular myocyte // *Biophys J.* – 2006. – Vol. 91. – P. 1564–1589.
53. Cotter P.A., Chepuri V., Gennis R.B., Gunsalus R.P. Cytochrome o (cyoABCDE) and d (cydAB) oxidase gene expression in *Escherichia coli* is regulated by oxygen, pH, and the fnr gene product // *J Bacteriol.* – 1990. – Vol. 172. – № 11. – P. 6333-6338.

54. Cox G.B., Gibson F., Pittard J. Mutant strains of *Escherichia coli* K-12 unable to form ubiquinone // *J Bacteriol.* – 1968. – Vol. 95. – № 5. – P. 1591-1598.
55. Cristobal S., de Gier J.W., Nielsen H., von Heijne G. Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli* // *EMBO J.* – 1999. – Vol. 18. – P. 2982-2990.
56. Daniels C., Bole D., Quay S., Oxender D. Role for membrane potential in the secretion of protein into the periplasm of *Escherichia coli* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1981. – Vol. 78. – P. 5396-5400.
57. Darwin A., Tormay P., Page L, Griffiths L, Cole J. Identification of the formate dehydrogenases and genetic determinants of formate-dependent nitrite reduction by *Escherichia coli* K12 // *J. Gen Microbiol.* – 1993. - Vol. 139. – № 8. – P. 1829-1840.
58. Darwin A.J., Tyson K.L., Busby S.J., Stewart V. Differential regulation by the homologous response regulators NarL and NarP of *Escherichia coli* K-12 depends on DNA binding site arrangement // *Mol. Microbiol.* – 1997. – Vol. 25. – № 3. – P. 583-595.
59. Darwin A.J., Ziegelhoffer E.C., Kiley P.J., Stewart V. Fnr, NarP, and NarL regulation of *Escherichia coli* K-12 napF (periplasmic nitrate reductase) operon transcription in vitro // *J Bacteriol.* – 1998. – Vol 180. – № 16. – P. 4192-4198.
60. Deckers-Hebestreit G., Altendorf K. The F₀F₁-type ATP synthases of bacteria: structure and function of the F₀ complex // *Annu Rev Microbiol.* – 1996. – Vol. 50. – P. 791-824.
61. Dibden D.P., Green J. In vivo cycling of the *Escherichia coli* transcription factor FNR between active and inactive states // *Microbiology.* – 2005. – Vol. 151. – Pt 12. – P. 4063-4070.
62. Dyall S.D., Yan W., Delgadillo-Correa M.G., Lunceford A., Loo J.A., Clarke C.F., Johnson P.J. Non-mitochondrial complex I proteins in a hydrogenosomal oxidoreductase complex // *Nature.* – 2004. – Vol. 431. – № 7012. - P. 1103-1107.
63. Edwards J. S., Ibarra R. U., Palsson B. O. *In silico* predictions of *Escherichia coli* metabolic capabilities are consistent with experimental data // *Nat. Biotechnol.* – Vol. 19. – P. 125-130.
64. Edwards J.S., Palsson B.O. The *Escherichia coli* MG1655 *in silico* metabolic genotype: its definition, characteristics, and capabilities // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2000. – Vol. 97. – № 10. – P. 5528-5533.

65. Efremov R.G., Sazanov L.A. The coupling mechanism of respiratory complex I - a structural and evolutionary perspective // *Biochim Biophys Acta*. – 2012. – Vol. 1817. – № 10. – P. 1785-1795.
66. Eiglmeier K., Honore N., Iuchi S., Lin E.C., Cole S.T. Molecular genetic analysis of FNR-dependent promoters // *Mol Microbiol*. – 1989. – Vol. 3. – № 7. – P. 869-878.
67. Eimer E., Frobel J., Blummel A.S., Muller M. TatE as a Regular Constituent of Bacterial Twin-arginine Protein Translocases // *J Biol Chem*. – 2015. – Vol. 290. – № 49. – P. 29281-29289.
68. Etzold C., Deckers-Hebestreit G., Altendorf K. Turnover number of *Escherichia coli* F₀F₁ ATP synthase for ATP synthesis in membrane vesicles // *Eur J Biochem*. – 1997. – Vol. 243. – № 1-2. – P. 336-343.
69. Facey S.J., Kuhn A. Membrane integration of *E. coli* model membrane proteins // *Biochim Biophys Acta*. – 2004. – Vol. 1694. – № 1-3. – P. 55-66.
70. Fillingame R.H., Angevine C.M., Dmitriev O.Y. Mechanics of coupling proton movements to c-ring rotation in ATP synthase // *FEBS Lett*. – 2003. – Vol. 555. – № 1. – P. 29-34.
71. Fischer S., Graber P., Turina P. The activity of the ATP synthase from *Escherichia coli* is regulated by the transmembrane proton motive force // *J Biol Chem*. – 2000. – Vol. 275. – № 39. – P. 30157-30162.
72. Francis K., Patel P., Wendt J.C., Shanmugam K.T. Purification and characterization of two forms of hydrogenase isoenzyme 1 from *Escherichia coli* // *J Bacteriol*. – 1990. – Vol. 172. – № 10. – P. 5750-5757.
73. Futai M., Nakanishi-Matsui M., Okamoto H., Sekiya M., Nakamoto R.K. Rotational catalysis in proton pumping ATPases: from *E. coli* F-ATPase to mammalian V-ATPase // *Biochim Biophys Acta*. – 2012. – Vol. 1817. – № 10. – P. 1711-1721.
74. Garlid K.D., Paucek P. Mitochondrial potassium transport: the K(+) cycle // *Biochim Biophys Acta*. – 2003. – Vol. 1606. – № 1-3. – P. 23-41.
75. Gibert I., Llagostera M., Barbe J. Regulation of *ubiG* gene expression in *Escherichia coli* // *J Bacteriol*. – 1988. – Vol. 170. – № 3. – P. 1346-1349.
76. Godfrey R.E., Lee D.J., Busby S.J.W., Browning D.F. Regulation of *nrf* operon expression in pathogenic enteric bacteria: sequence divergence reveals new regulatory complexity // *Mol Microbiol*. 2017. – Vol. 104. – № 4. – P. 580-594.

77. Graham L.L., Harris R., Villiger W., Beveridge T.J. Freeze-substitution of gram-negative eubacteria: general cell morphology and envelope profiles // *J Bacteriol.* – 1991. – Vol. 173. – P. 1623–1633.
78. Green J., Bennett B., Jordan P., Ralph E.T., Thomson A.J., Guest J.R. Reconstitution of the [4Fe-4S] cluster in FNR and demonstration of the aerobic-anaerobic transcription switch in vitro // *Biochem J.* – 1996. – 316. – Pt 3. – P. 887-892.
79. Gross R., Arico B., Rappuoli R. Families of bacterial signal-transducing proteins // *Mol Microbiol.* – 1989. – Vol. 3. – № 11. – P. 1661-1667.
80. Grove J., Tanapongpipat S., Thomas G., Griffiths L., Crooke H., Cole J. *Escherichia coli* K-12 genes essential for the synthesis of c-type cytochromes and a third nitrate reductase located in the periplasm // *Mol Microbiol.* – 1996. – Vol. 19. – № 3. – P. 467-481.
81. Hakobyan M., Sargsyan H., Bagramyan K. Proton translocation coupled to formate oxidation in anaerobically grown fermenting *Escherichia coli* // *Biophys Chem.* – 2005. – Vol. 115. – P. 55-61.
82. Harborne N.R., Griffiths L., Busby S.J., Cole J.A. Transcriptional control, translation and function of the products of the five open reading frames of the *Escherichia coli nir* operon // *Mol. Microbiol.* – 1992. – Vol. 6. – P. 2805-2813.
83. Harrington J.C., Wong S.M., Rosadini C.V., Garifulin O., Boyartchuk V., Akerley B.J. Resistance of *Haemophilus influenzae* to reactive nitrogen donors and gamma interferon-stimulated macrophages requires the formate-dependent nitrite reductase regulator-activated ytfE gene // *Infect Immun.* – 2009. – Vol. 77. – № 5. – P. 1945-1958.
84. Hatzixanthis K, Palmer T, Sargent F. A subset of bacterial inner membrane proteins integrated by the twin-arginine translocase // *Mol Microbiol.* – 2003. – Vol. 49. – № 5. – P. 1377-1390.
85. Helen D., Kim H., Tytgat B., Anne W. Highly diverse nirK genes comprise two major clades that harbour ammonium-producing denitrifiers // *BMC Genomics.* – 2016. – Vol. 17. – № 155.
86. Henikoff S., Wallace J.C., Brown J.P. Finding protein similarities with nucleotide sequence databases // *Methods Enzymol.* – 1990. – Vol. 183. – P. 111-132.
87. Henkel S.G., Ter Beek A., Steinsiek S., Stagge S., Bettenbrock K., de Mattos M.J., Sauter T., Sawodny O., Ederer M. Basic regulatory principles of *Escherichia coli*'s electron transport chain for varying oxygen conditions // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – № 9.

88. Holzhutter H.G., Henke W., Dubiel W., Gerber G. A mathematical model to study short-term regulation of mitochondrial energy transduction // *Biochim Biophys Acta.* – 1985. – Vol. 810. – № 2. – P. 252-268.
89. Hopper S., Babst M., Schlensog V., Fischer H.M., Hennecke H., Böck A. Regulated expression in vitro of genes coding for formate hydrogenlyase components of *Escherichia coli* // *J Biol Chem.* - 1994. – Vol. 269. – № 30. – P. 19597-19604.
90. Iobbi C., Santini C.L., Bonnefoy V., Giordano G. Biochemical and immunological evidence for a second nitrate reductase in *Escherichia coli* K12 // *Eur J Biochem.* – 1987. – Vol. 168. - № 2. – P. 451-459.
91. Jack R.L., Sargent F., Berks B.C., Sawers G., Palmer T. Constitutive expression of *Escherichia coli* *tat* genes indicates an important role for the twin-arginine translocase during aerobic and anaerobic growth // *J Bacteriol.* – 2001. – Vol. 183. – № 5. – P. 1801-1804.
92. Jackson R.H., Cole J.A., Cornish-Bowden A. The steady-state kinetics of the NADH-dependent nitrite reductase from *Escherichia coli* K 12. Nitrite and hydroxylamine reduction // *Biochem. J.* – 1981. – Vol. 199. – P. 171-178.
93. Jackson R.H., Cornish-Bowden A., Cole J.A. Prosthetic groups of the NADH-dependent nitrite reductase from *Escherichia coli* K12 // *Biochem J.* – 1981. – Vol. 193. – № 3. – P. 861-867.
94. Jayaraman P.S., Gaston K.L., Cole J.A., Busby S.J. The *nirB* promoter of *Escherichia coli*: location of nucleotide sequences essential for regulation by oxygen, the FNR protein and nitrite // *Mol Microbiol.* -1988. – Vol. 2. – № 4. – P. 527-530.
95. Jia W., Cole J.A. Nitrate and nitrite transport in *Escherichia coli* // *Biochem Soc Trans.* – 2005. – Vol. 33. – Pt. 1. – P. 159-161.
96. Jia W., Tovell N., Clegg S., Trimmer M., Cole J. A single channel for nitrate uptake, nitrite export and nitrite uptake by *Escherichia coli* NarU and a role for NirC in nitrite export and uptake // *Biochem. J.* – 2009. – Vol. 417. – P. 297-304.
97. Jimenez D.J., Andreote F.D., Chaves D., Montana J.S., Osorio-Forero C., Junca H., Zambrano M.M., Baena S. Structural and functional insights from the metagenome of an acidic hot spring microbial planktonic community in the Colombian Andes // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – № 12.

98. Jones S.A., Chowdhury F.Z., Fabich A.J., Anderson A., Schreiner D.M., House A.L., Autieri S.M., Leatham M.P., Lins J.J., Jorgensen M., Cohen P.S., Conway T. Respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine // *Infect Immun.* – 2007. – Vol. 75. – № 10. – P. 4891-4899.
99. Jones S.A., Gibson T., Maltby R.C., Chowdhury F.Z., Stewart V., Cohen P.S., Conway T. Anaerobic respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine // *Infect Immun.* – 2011. – Vol. 79. – № 10. – P. 4218-4226.
100. Jormakka M., Tornroth S., Byrne B., Iwata S. Molecular basis of proton motive force generation: structure of formate dehydrogenase-N // *Science.* – 2002. – Vol. 295. – № 5561. – P. 1863-1868.
101. Kaiser M., Sawers G. Nitrate repression of the *Escherichia coli* pfl operon is mediated by the dual sensors NarQ and NarX and the dual regulators NarL and NarP // *J Bacteriol.* 1995. – Vol. 177. – № 13. – P. 3647-3655.
102. Kaldorf M., Linne von Berg K.H., Meier U., Servos U., Bothe H. The reduction of nitrous oxide to dinitrogen by *Escherichia coli* // *Arch Microbiol.* – 1993. – Vol. 160. – № 6. – P. 432-439.
103. Kasimoglu E., Park S.J., Malek J., Tseng C.P., Gunsalus R.P. Transcriptional regulation of the proton-translocating ATPase (atpIBEFHAGDC) operon of *Escherichia coli*: control by cell growth rate // *J Bacteriol.* – 1996. – Vol. 178. – № 19. – P. 5563-5567.
104. Kazantsev F., Akberdin I., Lashin S., Ree N., Timonov V., Ratushny A., Khlebodarova T., Likhoshvai V. MAMMOTH: A new database for curated mathematical models of biomolecular systems // *J Bioinform Comput Biol.* – 2017.
105. Kemp G.L., Clarke T.A., Marritt S.J., Lockwood C., Poock S.R., Hemmings A.M., Richardson D.J., Cheesman M.R., Butt J.N. Kinetic and thermodynamic resolution of the interactions between sulfite and the pentahaem cytochrome NrfA from *Escherichia coli* // *Biochem. J.* – 2010. – Vol. 431. – P. 73-80.
106. Kern M., Simon J. Electron transport chains and bioenergetics of respiratory nitrogen metabolism in *Wolinella succinogenes* and other Epsilonproteobacteria // *Biochim Biophys Acta.* – 2009. – Vol. 1787. – № 6. – P. 646-656.
107. Khlebodarova T.M., Lashin S.A., Apasieva N.V. Gene network reconstruction and mathematical modeling of *E. coli* respiration: regulation of F₀F₁-ATP synthase by metal ions // *BGRS.* – 2006. – Vol. 2. – P. 55.

108. Khlebodarova T.M., Ree N.A., Likhoshvai V.A. On the control mechanisms of the nitrite level in *Escherichia coli* cells: the mathematical model // BMC Microbiol. – 2016. – Vol. 16. – Suppl 1:7.
109. Kim J.I., Varner J.D., Ramkrishna D. A hybrid model of anaerobic E. coli GJT001: combination of elementary flux modes and cybernetic variables // Biotechnol Prog. – 2008. – Vol. 24. – № 5. – P. 993-1006.
110. Klamt S., Grammel H., Straube R., Ghosh R., Gilles E.D. Modeling the electron transport chain of purple non-sulfur bacteria // Mol Syst Biol. – 2008. – Vol. 4. – № 156.
111. Klotz M.G., Stein L.Y. Nitrifier genomics and evolution of the nitrogen cycle // FEMS Microbiol Lett. – 2008. – Vol. 278. – № 2. – P. 146-156.
112. Kolesnikow T., Schröder I., Gunsalus R.P. Regulation of narK gene expression in *Escherichia coli* in response to anaerobiosis, nitrate, iron, and molybdenum // J. Bacteriol. – 1992. – Vol. 174. – P. 7104-7111.
113. Korzeniewski B., Froncisz W. An extended dynamic model of oxidative phosphorylation // Biochim Biophys Acta. – 1991. – Vol. 1060. – № 2. – P. 210-223.
114. Korzeniewski B., Zoladz J.A. A model of oxidative phosphorylation in mammalian skeletal muscle // Biophys Chem. – 2001. – Vol. 92. – P. 17-34.
115. Kwon O., Druce-Hoffman M., Meganathan R. Regulation of the Ubiquinone (Coenzyme Q) Biosynthetic Genes *ubiCA* in *Escherichia coli* // Curr Microbiol. – 2005. – Vol. 50. – № 4. – P. 180-189.
116. Laurinavichene T.V., Tsygankov A.A. H₂ consumption by *Escherichia coli* coupled via hydrogenase 1 or hydrogenase 2 to different terminal electron acceptors // FEMS Microbiol Lett. – 2001. – Vol. 202. – № 1. – P. 121-124.
117. Lawrence J., Cox G.B., Gibson F. Biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli* K-12: biochemical and genetic characterization of a mutant unable to convert chorismate into 4-hydroxybenzoate // J Bacteriol. – 1974. – Vol. 118. – № 1. – P. 41-45.
118. Lee A.I., Delgado A., Gunsalus R.P. Signal-dependent phosphorylation of the membrane-bound NarX two-component sensor-transmitter protein of *Escherichia coli*: nitrate elicits a superior anion ligand response compared to nitrite // J Bacteriol. – 1999. – Vol. 181. – № 17. – P. 5309-5316.
119. Lee P.A., Tullman-Ercek D., Georgiou G. The bacterial twin-arginine translocation pathway // Annu Rev Microbiol. – 2006. – Vol. 60. – P. 373-395.

120. Leonhartsberger S., Korsa I., Böck A. The molecular biology of formate metabolism in enterobacteria // *J Mol Microbiol Biotechnol.* – 2002. – Vol. 4. – № 3. – P. 269-276.
121. Li J., Stewart V. Localization of upstream sequence elements required for nitrate and anaerobic induction of *fdn* (formate dehydrogenase-N) operon expression in *Escherichia coli* K-12 // *J Bacteriol.* – 1992. – Vol. 174. – № 15. – P. 4935-4942.
122. Li S.F., DeMoss J.A. Location of sequences in the *nar* promoter of *Escherichia coli* required for regulation by Fnr and NarL. *J Biol Chem* // 1988. – Vol. 263. – № 27. – P. 13700-13705.
123. Likhoshvai V., Ratushny A. Generalized hill function method for modeling molecular processes // *J Bioinform Comput Biol.* – 2007. – Vol. 5. – № 2B. – P.521-531.
124. Lin J.T., Goldman B.S., Stewart V. Structures of genes *nasA* and *nasB*, encoding assimilatory nitrate and nitrite reductases in *Klebsiella pneumoniae* M5a1 // *J Bacteriol.* – 1993. – Vol. 175. – № 8. – P. 2370-2378.
125. Liu M.C., Bakel B.W., Liu M.Y., Dao T.N. Purification of *Vibrio fischeri* nitrite reductase and its characterization as a hexaheme c-type cytochrome // *Arch Biochem Biophys.* – 1988. – Vol. 262. – № 1. – P. 259-265.
126. Lockwood C., Butt J.N., Clarke T.A., Richardson D.J. Molecular interactions between multihaem cytochromes: probing the protein-protein interactions between pentahaem cytochromes of a nitrite reductase complex // *Biochem. Soc. Trans.* – 2011. – Vol. 39. – P. 263-268.
127. Lü W., Schwarzer N.J., Du J., Gerbig-Smentek E., Andrade S.L., Einsle O. Structural and functional characterization of the nitrite channel NirC from *Salmonella typhimurium* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – Vol. 109. – P. 18395-18400.
128. Lukey M.J., Parkin A., Roessler M.M., Murphy B.J., Harmer J., Palmer T., Sargent F., Armstrong F.A. How *Escherichia coli* is equipped to oxidize hydrogen under different redox conditions // *J Biol Chem.* – 2010. – Vol. 285. – № 6. – P. 3928-2938.
129. MacDonald H., Pope N.R., Cole J.A. Isolation, characterization and complementation analysis of *nirB* mutants of *Escherichia coli* deficient only in NADH-dependent nitrite reductase activity // *J Gen Microbiol.* – 1985. – Vol. 131. – № 10. – P. 2771-2782.
130. Maeda T., Sanchez-Torres V., Wood T.K. *Escherichia coli* hydrogenase 3 is a reversible enzyme possessing hydrogen uptake and synthesis activities // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2007. – Vol. 76. – № 5. – P. 1035-1042.

131. Majewski R. A., Domach M. M. Simple constrained optimization view of acetate overflow in *E. coli* // *Biotechnol. Bioeng.* – 1990. – Vol. 35. – P. 732-738.
132. Maloney P.C., Kashket E.R., Wilson T.H. A protonmotive force drives ATP synthesis in bacteria // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1974. – Vol. 71. – № 10. – P. 3896-3900.
133. Mannan A.A., Toya Y., Shimizu K., McFadden J., Kierzek A.M., Rocco A. Integrating Kinetic Model of *E. coli* with Genome Scale Metabolic Fluxes Overcomes Its Open System Problem and Reveals Bistability in Central Metabolism // *PLoS One.* 2015. – Vol. 10. – № 10.
134. Mäntsälä P., Zalkin H. Glutamate synthase. Properties of the glutamine-dependent activity // *J Biol Chem.* – 1976. – Vol. 251. – № 11. – P. 3294-3299.
135. Maris A.E., Sawaya M.R., Kaczor-Grzeskowiak M., Jarvis M.R., Bearson S.M., Kopka M.L., Schroder I., Gunsalus R.P., Dickerson R.E. Dimerization allows DNA target site recognition by the NarL response regulator // *Nat. Struct. Biol.* – 2002. – Vol. 9. – № 10. – P. 771-778.
136. Matos C.F., Di Cola A., Robinson C. TatD is a central component of a Tat translocon-initiated quality control system for exported FeS proteins in *Escherichia coli* // *EMBO.* – 2009. – Vol. 10. – № 5. – P. 474-479.
137. McDowall J.S., Murphy B.J., Haumann M., Palmer T., Armstrong F.A., Sargent F. Bacterial formate hydrogenlyase complex // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2014. – Vol. 111. – № 38. – P. 3948-3956.
138. Meganathan R., Kwon O. Biosynthesis of Menaquinone (Vitamin K2) and Ubiquinone (Coenzyme Q) // *EcoSal Plus.* – 2009. – Vol. 3. – № 2.
139. Meganathan R., Neidhard F. C. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. Vol. 1. - American Society for Microbiology, 1996. – 2822 p.
140. Mnatsakanyan N., Bagramyan K., Trchounian A. Hydrogenase 3 but not hydrogenase 4 is major in hydrogen gas production by *Escherichia coli* formate hydrogenlyase at acidic pH and in the presence of external formate // *Cell Biochem Biophys.* – 2004. – Vol. 41. – № 3. – P. 357-366.
141. Moir J.W., Wood N.J. Nitrate and nitrite transport in bacteria // *Cell Mol Life Sci.* – 2001. – Vol. 58. – № 2. – P. 215-224.

142. Moreno-Vivian C., Cabello P., Martinez-Luque M., Blasco R., Castillo F. Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases // *J Bacteriol.* – 1999. – Vol. 181. – № 21. – P. 6573-6584.
143. Morimoto Y.V., Minamino T. Structure and function of the bi-directional bacterial flagellar motor // *Biomolecules.* – 2014. – Vol. 4. – № 1. – P. 217-234.
144. Motteram P.A.S., McCarthy J.E.G., Ferguson S.J., Jackson J.B. Cole J.A. Energy conservation during the formate-dependent reduction of nitrite by *Escherichia coli* // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1981. – Vol. 12. – P. 317-320.
145. Muller R., Dahm C., Schulte G., Leistner E. An isochorismate hydroxymutase isogene in *Escherichia coli* // *FEBS Lett.* – 1996. – Vol. 378. – № 2. – P. 131-134.
146. Nakahigashi K., Miyamoto K., Nishimura K., Inokuchi H. Isolation and characterization of a light-sensitive mutant of *Escherichia coli* K-12 with a mutation in a gene that is required for the biosynthesis of ubiquinone // *J Bacteriol.* – 1992. – Vol. 174. – № 22. P. 7352-7359.
147. Nakanishi-Matsui M., Sekiya M., Futai M. Rotating proton pumping ATPases: subunit/subunit interactions and thermodynamics // *IUBMB Life.* – 2013. – Vol. 65. – № 3. – P. 247-254.
148. Nguyen M.H., Dudycha S.J., Jafri M.S. Effect of Ca²⁺ on cardiac mitochondrial energy production is modulated by Na⁺ and H⁺ dynamics // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2007. – Vol. 292. – P. 2004-2020.
149. Noguchi K., Riggins D.P., Eldahan K.C., Kitko R.D., Slonczewski J.L. Hydrogenase-3 contributes to anaerobic acid resistance of *Escherichia coli* // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5. – №4.
150. Noriega C.E., Lin H.Y., Chen L.L., Williams S.B., Stewart V. Asymmetric cross-regulation between the nitrate-responsive NarX-NarL and NarQ-NarP two-component regulatory systems from *Escherichia coli* K-12 // *Mol Microbiol.* – 2010. – Vol. 75. – № 2. – P. 394-412.
151. Orth J.D., Thiele I., Palsson B.Ø. What is flux balance analysis? // *Nat Biotechnol.* – 2010. – Vol. 28. – № 3. – P. 245-248.
152. Outten C.E., O'Halloran T.V. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. – *Science.* – 2001. – Vol. 292. – № 5526. – P. 2488-2492.

153. Page L., Griffiths L., Cole J.A. Different physiological roles of two independent pathways for nitrite reduction to ammonia by enteric bacteria // Arch Microbiol. – 1990. – Vol. 154. – № 4. – P. 349-354.
154. Pannala V.R., Camara A.K., Dash R.K. Modeling the detailed kinetics of mitochondrial cytochrome c oxidase: Catalytic mechanism and nitric oxide inhibition // J Appl Physiol. (1985). – 2016. – Vol. 121. – № 5. – P. 1196-1207.
155. Percy B.E., Cox S.J., Shalel-Levanon S., San K.Y., Bennett G. A kinetic model of oxygen regulation of cytochrome production in *Escherichia coli* // J. Theor. Biol. – 2006. – Vol. 242. – P. 547-563.
156. Pinske C., Sargent F. Exploring the directionality of *Escherichia coli* formate hydrogenlyase: a membrane-bound enzyme capable of fixing carbon dioxide to organic acid // Microbiologyopen. – 2016. – Vol. 5. – № 5. – P. 721-737.
157. Poock S.R., Leach E.R., Moir J.W., Cole J.A., Richardson D.J. Respiratory detoxification of nitric oxide by the cytochrome c nitrite reductase of *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277. – P. 23664-23669.
158. Pope N.R., Cole J.A. Generation of a membrane potential by one of two independent pathways for nitrite reduction by *Escherichia coli* // J Gen Microbiol. – 1982. – Vol. 128. – №1. – P. 219-222.
159. Potter, L. C., and J. A. Cole. Essential roles for the products of the napABCD genes, but not napFGH, in periplasmic nitrate reduction by *Escherichia coli* K-12 // Biochem. J. – 1999. – Vol. 344. – P. 69-76.
160. Price C. E., Driessen A. J. M. Biogenesis of membrane bound respiratory complexes in *Escherichia coli* // Biochimica et Biophysica Acta. – 2010. – Vol. 1803. – № 6. – P. 748-766
161. Rabin R.S., Stewart V. Dual response regulators (NarL and NarP) interact with dual sensors (NarX and NarQ) to control nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli* K-12 // J Bacteriol. – 1993. – Vol. 175. – № 11. – P. 3259-3268.
162. Ratushny A.V., Khlebodarova T.M. Mathematical modeling of regulation of cyoABCDE operon expression in *Escherichia coli*. // BGRS. – 2006. – Vol. 2. – P. 49.
163. Ravcheev D.A., Rakhmaninova A.B., Mironov A.A., Gelfand MS. Comparative genomics analysis of nitrate and nitrite respiration in gamma proteobacteria // Mol Biol (Mosk). – 2005. – Vol. 39. – № 5. – P. 832-846.

164. Ree N.A., Likhoshvai V.A., Khlebodarova T.M. Mathematical model of membrane potential formation at *E. coli* growth on nitrite. «The 12th IC on bioinformatics of genome regulation and structure – BGRS» (Novosibirsk, Russia). – 2018. – P. 60.
165. Ree N.A., Likhoshvai V.A., Khlebodarova T.M. Membrane potential as a new factor, modulating periplasmic nitrite reductase activity // SBB. – 2017. – p. 56-57.
166. Ree N.A., Likhoshvai V.A., Khlebodarova T.M. The mathematical modeling of nitrite metabolism regulation in *Escherichia coli* cell during nitrate respiration under anaerobic conditions. «The 7th IC on bioinformatics of genome regulation and structure – BGRS» (Novosibirsk, Russia). – 2010. – P. 242.
167. Ree N.A., Likhoshvai V.A., Khlebodarova T.M. Role of membrane potential in nitrite utilization by *Escherichia coli* cells under low substrate concentration: the mathematical model. «The 10th IC on bioinformatics of genome regulation and structure – BGRS» (Novosibirsk, Russia). – 2016. – P. 252.
168. Reed J., Vo T., Schilling C., Palsson B. An expanded genome-scale model of *Escherichia coli* K-12 (iJR904 GSM/GPR) // Genome Biol. – 2003. – Vol. 4. – № 9.
169. Reed J.L., Palsson B.O. Thirteen years of building constraint-based in silico models of *Escherichia coli* // J Bacteriol. – 2003. – Vol. 185. - № 9. – P. 2692-2699.
170. Rendon J., Pilet E., Fahs Z., Seduk F., Sylvi L., Hajj Chehade M., Pierrel F., Guigliarelli B., Magalon A., Grimaldi S. Demethylmenaquinol is a substrate of *Escherichia coli* nitrate reductase A (NarGHI) and forms a stable semiquinone intermediate at the NarGHI quinol oxidation site // Biochim Biophys Acta. – 2015. – Vol. 1847. – № 8. – P. 739-747.
171. Richard D.J., Sawers G., Sargent F., McWalter L., Boxer D.H. Transcriptional regulation in response to oxygen and nitrate of the operons encoding the [NiFe]hydrogenases 1 and 2 of *Escherichia coli* // Microbiology. – 1999. – Vol. 145. – P. 2903-2912.
172. Rodionov D.A., Dubchak I.L., Arkin A.P., Alm E.J., Gelfand M.S. Dissimilatory metabolism of nitrogen oxides in bacteria: comparative reconstruction of transcriptional networks // PLoS Comput Biol. – 2005. – Vol. 1. – № 5.
173. Rodrigue A., Chanal A., Beck K., Muller M., Wu L.F. Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial Tat pathway // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274. – P. 13223-13228.

174. Rossmann R., Sawers G., Böck A. Mechanism of regulation of the formate-hydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate, and pH: definition of the formate regulon // *Mol Microbiol.* – 1991. – Vol. 5. – № 11. – P. 2807-2814.
175. Rowley G., Hensen D., Felgate H., Arkenberg A., Appia-Ayme C., Prior K., Harrington C., Field S.J., Butt J.N., Baggs E., Richardson D.J. Resolving the contributions of the membrane-bound and periplasmic nitrate reductase systems to nitric oxide and nitrous oxide production in *Salmonella enterica serovar Typhimurium* // *Biochem J.* – 2012. – Vol. 441. – № 2. – P. 755-762.
176. Rycovska A., Hatahet L., Fendler K., Michel H. The nitrite transport protein NirC from *Salmonella typhimurium* is a nitrite/proton antiporter // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2012. – Vol. 1818. – P. 1342-1350.
177. Saa A., Siqueira K.M. Modeling the ATP production in mitochondria // *Bull Math Biol.* – 2013. – Vol. 75. – № 9. – P. 1636-1651.
178. Saito R., Takeuchi A., Himeno Y., Inagaki N., Matsuoka S. A simulation study on the constancy of cardiac energy metabolites during workload transition // *J Physiol.* – 2016. – Vol. 594. – № 23. – P. 6929-6945.
179. Salmon K., Hung S.P., Mekjian K., Baldi P., Hatfield G.W., Gunsalus R.P. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of oxygen availability and FNR // *J Biol Chem.* – 2003. – Vol. 278. – № 32. – P. 29837-29855.
180. Santillan M. On the use of the Hill Functions in Mathematical Models of Gene Regulatory Networks // *Math. Model. Nat. Phenom* – Vol. 3. – №. 2. – 2008. – P. 85-97.
181. Sargent F. The Model [NiFe]-Hydrogenases of *Escherichia coli* // *Adv Microb Physiol.* – 2016. – Vol. 68. – P. 433-507.
182. Sawers R. G. The hydrogenases and formate dehydrogenases of *Escherichia coli* // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 1994. – Vol. 66. – P. 57-88.
183. Sawers R.G. Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli* // *Biochem Soc Trans.* – 2005. – Vol. 33. – P. 42-46.
184. Sawers R.G., Blokesch M., Bock A. Anaerobic Formate and Hydrogen Metabolism // *EcoSal Plus.* – 2004. – Vol. 1. – № 1.
185. Sawers R.G., Jamieson D.J., Higgins C.F., Boxer D.H. Characterization and physiological roles of membrane-bound hydrogenase isoenzymes from *Salmonella typhimurium* // *J Bacteriol.* – 1986. – Vol. 168. – №. 1. – P. 398-404.

186. Schilling C.H., Edwards J.S., Palsson B.O. Toward metabolic phenomics: analysis of genomic data using flux balances // *Biotechnol Prog.* – 1999. – Vol. 15. – № 3. – P. 288-295.
187. Schuster S., Boley D., Moller P., Stark H., Kaleta C. Mathematical models for explaining the Warburg effect: a review focussed on ATP and biomass production // *Biochem Soc Trans.* – 2015. – Vol. 43. – № 6. – P. 1187-1194.
188. Self W.T., Hasona A., Shanmugam K.T. Expression and regulation of a silent operon, *hyf*, coding for hydrogenase 4 isoenzyme in *Escherichia coli* // *J Bacteriol.* – 2004. – Vol. 186. – № 2. – P. 580-587.
189. Sharma P., Teixeira de Mattos M.J., Hellingwerf K.J., Bekker M. On the function of the various quinone species in *Escherichia coli* // *FEBS J.* – 2012. – Vol. 279. – № 18. – P. 3364-3373.
190. Shestopalov A.I., Bogachev A.V., Murtazina R.A., Viryasov M.B., Skulachev V.P. Aeration-dependent changes in composition of the quinone pool in *Escherichia coli*. Evidence of post-transcriptional regulation of the quinone biosynthesis // *FEBS Lett.* – 1997. – Vol. 404. – № 2-3. – P. 272-274.
191. Silhavy T.J., Kahne D., Walker S. The bacterial cell envelope // *Cold. Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2010. – Vol. 2. – № 5. – P. a000414.
192. Simon J. Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification // *FEMS Microbiol Rev.* – 2002. – Vol. 26. – № 3. – P. 285-309.
193. Skibinski D.A., Golby P., Chang Y.S., Sargent F., Hoffman R., Harper R., Guest J.R., Attwood M.M., Berks B.C., Andrews S.C. Regulation of the hydrogenase-4 operon of *Escherichia coli* by the sigma(54)-dependent transcriptional activators FhlA and HyfR // *J Bacteriol.* – 2002. – Vol. 184. – № 23. – P. 6642-6653.
194. Soballe B., Poole R.K. Aerobic and anaerobic regulation of the *ubiCA* operon, encoding enzymes for the first two committed steps of ubiquinone biosynthesis in *Escherichia coli* // *FEBS Lett.* - 1997. – Vol. 414. - № 2. – P. 373-376.
195. Sparacino-Watkins C., Stolz J.F., Basu P. Nitrate and periplasmic nitrate reductases // *Chem Soc Rev.* – 2014. – Vol. 43. – № 2. – P. 676-706.
196. Spiro S., Guest J.R. FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli* // *FEMS Microbiol Rev.* – 1990. – Vol. 6. – № 4. – P. 399-428.

197. Stanley N.R., Sargent F., Buchanan G., Shi J., Stewart V., Palmer T., Berks B.C. Behaviour of topological marker proteins targeted to the Tat protein transport pathway // *Mol Microbiol.* – 2002. – Vol. 43. – № 4. – P. 1005-1021.
198. Stewart V. Biochemical Society Special Lecture. Nitrate- and nitrite-responsive sensors NarX and NarQ of proteobacteria // *Biochem Soc Trans.* – 2003. – Pt 1. – P. 1-10.
199. Stewart V., Berg B.L. Influence of nar (nitrate reductase) genes on nitrate inhibition of formate-hydrogen lyase and fumarate reductase gene expression in *Escherichia coli* K-12 // *J Bacteriol.* – 1988. – Vol. 170. – № 10. – P. 4437-4444.
200. Stewart V., Lu Y., Darwin A.J. Periplasmic nitrate reductase (NapABC enzyme) supports anaerobic respiration by *Escherichia coli* K-12 // *J Bacteriol.* – 2002. – Vol. 184. – № 5. – P. 1314-1323.
201. Stock J.B., Rauch B., Roseman S. Periplasmic space in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* – 1977. – Vol. 252. – P. 7850-7861.
202. Talmadge K., Gilbert W. Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1982. – Vol. 79. – P. 1830-1833.
203. Tiso M., Schechter A.N. Nitrate reduction to nitrite, nitric oxide and ammonia by gut bacteria under physiological conditions // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10. – № 3.
204. Tran Q.H., Uden G. Changes in the proton potential and the cellular energetics of *Escherichia coli* during growth by aerobic and anaerobic respiration or by fermentation // *Eur. J. Biochem.* – 1998. – Vol. 251. – P. 538-543.
205. Tseng C.P., Hansen A.K., Cotter P., Gunsalus R.P. Effect of cell growth rate on expression of the anaerobic respiratory pathway operons frdABCD, dmsABC, and narGHJI of *Escherichia coli* // *J Bacteriol.* – 1994. – Vol. 176. – № 21. – P. 6599-6605.
206. Tyson K., Metheringham R., Griffiths L., Cole J. Characterisation of *Escherichia coli* K-12 mutants defective in formate-dependent nitrite reduction: essential roles for hemN and the menFDBCE operon // *Arch Microbiol.* – 1997. – Vol. 168. – № 5. – P. 403-411.
207. Uden G., Achebach S., Holighaus G., Tran H.G., Wackwitz B., Zeuner Y. Control of FNR Function of *Escherichia coli* by O₂ and Reducing Conditions // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 4. – P. 263-268.
208. Uden G., Bongaerts J. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors // *Biochim Biophys Acta.* 1997. – Vol. 1320. – № 3. – P. 217-234.

209. Unden G., Schirawski J. The oxygen-responsive transcriptional regulator FNR of *Escherichia coli*: the search for signals and reactions // Mol Microbiol. – 1997. – Vol. 25. – № 2. – P. 205-210.
210. van Beilen J.W., Hellingwerf K.J. All Three Endogenous Quinone Species of *Escherichia coli* Are Involved in Controlling the Activity of the Aerobic/Anaerobic Response Regulator ArcA // Front Microbiol. – 2016. – Vol. 7. – №. 1339.
211. van Elsas J.D., Semenov A.V., Costa R., Trevors J.T. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects // ISME J. – 2011. – Vol. 5. – № 2. – P. 173-183.
212. van Wonderen J.H., Burlat B., Richardson D.J., Cheesman M.R., Butt J.N. The nitric oxide reductase activity of cytochrome c nitrite reductase from *Escherichia coli* // J. Biol.Chem. – 2008. – Vol. 283. – P. 9587-9594.
213. Varma A, Palsson BO. Metabolic capabilities of *Escherichia coli*: I. synthesis of biosynthetic precursors and cofactors. // J Theor Biol. – 1993. – Vol. 165. – P. 477-502.
214. Varma A., Boesch B. W., Palsson B. O. Stoichiometric interpretation of *Escherichia coli* glucose catabolism under various oxygenation rates // Appl. Environ. Microbiol. – 1993. – Vol. 59. – P. 2465-2473.
215. Vazquez A., Liu J., Zhou Y., Oltvai Z.N. Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: the Warburg effect revisited // BMC Syst Biol. – 2010. – Vol. 4. – № 58.
216. Walker M.S., DeMoss J.A. Phosphorylation and dephosphorylation catalyzed in vitro by purified components of the nitrate sensing system, NarX and NarL // J. Biol Chem. – 1993. – Vol. 268. – № 12. – P. 8391-8393.
217. Wang H., Gunsalus R.P. Coordinate regulation of the *Escherichia coli* formate dehydrogenase fdnGHI and fdhF genes in response to nitrate, nitrite, and formate: roles for NarL and NarP // J Bacteriol. – 2003. – Vol. 185. – № 17. – P. 5076-5085.
218. Wang H., Gunsalus R.P. The nrfA and nirB nitrite reductase operons in *Escherichia coli* are expressed differently in response to nitrate than to nitrite // J Bacteriol. – 2000. – Vol. 182. – № 20. – P. 5813-5822.
219. Wang H., Tseng C.P., Gunsalus R.P. The napF and narG nitrate reductase operons in *Escherichia coli* are differentially expressed in response to submicromolar concentrations of nitrate but not nitrite // J Bacteriol. – 1999. – Vol. 181. – № 17. – P. 5303-5308.

220. Warburg O. On the origin of cancer cells // *Science*. – 1956. – Vol. 123. – № 3191. – P. 309-314.
221. Warren M.J., Bolt E.L., Roessner C.A., Scott A.I., Spencer J.B., Woodcock S.C. Gene dissection demonstrates that the *Escherichia coli* *cysG* gene encodes a multifunctional protein // *Biochem J*. – 1994. – Vol. 302. – Pt 3. – P. 837-844.
222. Weaver D.S., Keseler I.M., Mackie A., Paulsen I.T., Karp P.D. A genome-scale metabolic flux model of *Escherichia coli* K-12 derived from the EcoCyc database // *BMC Syst Biol*. – 2014. – Vol. 8. – № 79.
223. Weingarten R.A., Grimes J.L., Olson J.W. Role of *Campylobacter jejuni* respiratory oxidases and reductases in host colonization // *Appl Environ Microbiol*. – 2008. – Vol. 74. – № 5. – P. 1367-1375.
224. Weiss B. Evidence for mutagenesis by nitric oxide during nitrate metabolism in *Escherichia coli* // *J Bacteriol*. – 2006. – Vol. 188. – №3. – P. 829-833.
225. Wiedenmann A., Dimroth P., von Ballmoos C. Deltapsi and DeltapH are equivalent driving forces for proton transport through isolated F(0) complexes of ATP synthases // *Biochim Biophys Acta*. – 2008. – Vol. 1777. – № 10. – P. 1301-1310.
226. Wilks J.C., Slonczewski J.L. pH of the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli*: rapid measurement by green fluorescent protein fluorimetry // *J Bacteriol*. – 2007. – Vol. 189. – № 15. – P. 5601-5607.
227. Williams S.B., Stewart V. Nitrate- and nitrite-sensing protein NarX of *Escherichia coli* K-12: mutational analysis of the amino-terminal tail and first transmembrane segment // *J Bacteriol*. – 1997. – Vol. 179. – № 3. – P. 721-729.
228. Winter S.E., Winter M.G., Xavier M.N., Thiennimitr P., Poon V., Keestra A.M. Host-derived nitrate boosts growth of *E. coli* in the inflamed gut // *Science*. American Association for the Advancement of Science. – 2013. – Vol. 339. – № 6120. – P. 708-711.
229. Wissenbach U., Kroger A., Uden G. The specific functions of menaquinone and demethylmenaquinone in anaerobic respiration with fumarate, dimethylsulfoxide, trimethylamine N-oxide and nitrate by *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*. – 1990. – Vol. 154. – № 1. – P. 60-66.
230. Wright D.N., Lockhart W.R. Environmental control of cell composition in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol*. – 1965. – Vol. 89. – P. 1026-1031.

231. Wu F., Yang F., Vinnakota K.C., Beard D.A. Computer modeling of mitochondrial tricarboxylic acid cycle, oxidative phosphorylation, metabolite transport, and electrophysiology // *J Biol Chem.* – 2007. – Vol. 282. – P. 24525-24537.
232. Wu H., Tyson K.L., Cole J.A., Busby S.J. Regulation of transcription initiation at the *Escherichia coli* nir operon promoter: a new mechanism to account for co-dependence on two transcription factors // *Mol Microbiol.* – 1998. – Vol. 27. – № 2. – P. 493-505.
233. Yang Y., Jobin C. Microbial imbalance and intestinal pathologies: connections and contributions // *Dis Model Mech.* – 2014. – Vol. 7. – № 10. – P. 1131-1142.
234. Yao Q., Peng D.C. Nitrite oxidizing bacteria (NOB) dominating in nitrifying community in full-scale biological nutrient removal wastewater treatment plants // *AMB Express.* – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 25.
235. Zhang H., Javor G.T. Regulation of the isofunctional genes *ubiD* and *ubiX* of the ubiquinone biosynthetic pathway of *Escherichia coli* // *FEMS Microbiol Lett.* – 2003. – Vol. 223. – № 1. – P. 67-72.
236. Zheng D., Constantinidou C., Hobman J.L., Minchin S.D. Identification of the CRP regulon using in vitro and in vivo transcriptional profiling // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – Vol. 32. – № 19. – P. 5874-5893.
237. Zimorski V., Ku C., Martin W.F., Gould S.B. Endosymbiotic theory for organelle origins // *Curr Opin Microbiol.* – 2014. – P. 38-48.